

1  
  
①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
  
PARIS

①1 N° de publication : **2 806 739**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
②1 N° d'enregistrement national : **00 03832**

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : C 12 N 15/12, C 07 K 14/47, 16/18, C 12 N 15/63, 5/  
10, A 01 K 67/027, G 01 N 33/53, C 12 Q 1/68, A 61 K 48/00,  
38/17, 39/395, A 61 P 1/00, 29/00, 37/00

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②2 Date de dépôt : 27.03.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 28.09.01 Bulletin 01/39.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *FONDATION JEAN DAUSSET-CEPH*  
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : HUGOT JEAN PIERRE, THOMAS  
GILLES, ZOULI MOHAMED, LESAGE SUZANNE et  
CHAMAILLARD MATHIAS.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 **GENES IMPLIQUES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN ET LEUR UTILISATION.**

⑤7 La présente invention concerne des gènes impliqués  
dans les maladies inflammatoires et/ ou immunes et cer-  
tains cancers, en particulier les maladies inflammatoires  
cryptogénétiques de l'intestin, ainsi que les protéines co-  
dées par ces gènes. Des méthodes de diagnostics de ma-  
ladies inflammatoires sont également des objets de la  
présente invention.

FR 2 806 739 - A1



La présente invention concerne des gènes impliqués dans les  
5 maladies inflammatoires et/ou immunes et certains cancers, en particulier les  
maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin, ainsi que les protéines  
codées par ces gènes. Des méthodes de diagnostics de maladies inflammatoires sont  
également des objets de la présente invention.

Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) sont des  
10 maladies caractérisées par une inflammation du tube digestif dont la cause est  
inconnue. Selon la localisation et les caractéristiques de l'inflammation on distingue  
deux entités nosologiques différentes: la rectocolite hémorragique (RCH) et la  
maladie de Crohn (MC). La RCH a été décrite par S Wilkes en 1865 tandis que le  
premier cas d'iléite régionale a été rapportée par Crohn en 1932. En réalité, il est  
15 possible que ces deux maladies soient beaucoup plus anciennes.

Les MICI sont des maladies chroniques qui évoluent tout au long de la vie et  
qui touchent environ 1 à 2 personnes sur 1000 habitants dans les pays occidentaux,  
ce qui représente entre 60.000 et 100.000 malades en France. Il s'agit de maladies  
apparaissant chez le sujet jeune (le pic d'incidence est dans la troisième décennie),  
20 évoluant par poussées entrecoupées de rémissions, avec des complications  
fréquentes telles que la dénutrition, le retard de croissance chez l'enfant, la  
démérialisation osseuse et à terme la dégénérescence maligne vers le cancer du  
colon. Il n'existe pas de traitement spécifique. Les thérapeutiques habituelles font  
appel aux anti-inflammatoires, aux immunosuppresseurs et à la chirurgie. Tous ces  
25 moyens thérapeutiques sont eux-mêmes source d'une morbidité iatrogène  
importante. Pour toutes ces raisons les MICI apparaissent comme un important  
problème de santé publique.

L'étiologie des MICI est actuellement inconnue. Des facteurs  
d'environnement sont impliqués dans la survenue de la maladie comme en  
30 témoignent l'augmentation séculaire d'incidence de la maladie et la concordance  
incomplète chez les jumeaux monozygotes. Les seuls facteurs de risque  
environnementaux actuellement reconnus sont 1) le tabac dont le rôle est néfaste

dans la MC et bénéfique dans la RCH et 2) l'appendicectomie qui a un rôle protecteur pour la RCH.

Une prédisposition génétique est depuis longtemps suspectée devant l'existence d'agrégations ethniques et familiales de ces maladies. En effet, les MICI  
5 sont plus fréquentes dans la population caucasienne et en particulier la population juive d'Europe centrale. Les formes familiales représentent de 6 à 20% des cas de MICI. Elles sont particulièrement fréquentes lorsque le début de la maladie est précoce. Cependant, ce sont les études chez les jumeaux qui ont permis de confirmer le caractère génétique de ces maladies. En effet, le taux de concordance  
10 entre jumeaux pour ces maladies est plus important chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes plaçant fortement pour une composante héréditaire aux MICI, en particulier à la MC. Selon toute vraisemblance, les MICI sont des maladies génétiques complexes faisant intervenir plusieurs gènes différents, en interaction entre eux et avec des facteurs d'environnement. Les MICI peuvent donc  
15 être classées dans le cadre des maladies multifactorielles.

Deux grandes stratégies ont été développées afin de mettre en évidence les gènes de susceptibilité aux MICI. La première repose sur l'analyse de gènes candidats pour des raisons physiopathologiques. Ainsi de nombreux gènes ont été proposés comme potentiellement importants pour les MICI. Il s'agit souvent de  
20 gènes ayant un rôle dans l'inflammation et la réponse immune. On peut citer les gènes HLA, TAP, TNF, MICA, le récepteur T du lymphocyte, ICAM1, l'interleukine 1, CCR5, etc. D'autres gènes participent à des fonctions diverses tels que GAI2, la motiline, MRAMP, HMLH1, etc. En réalité, aucun des différents gènes candidats étudiés n'a actuellement fait la preuve définitive de son rôle dans la  
25 survenue des MICI.

Le récent développement de cartes du génome humain utilisant des marqueurs génétiques hautement polymorphes a permis aux généticiens de développer une approche non ciblée sur l'ensemble du génome. Cette démarche, appelée aussi génétique inverse ou clonage positionnel, ne fait aucune hypothèse sur  
30 les gènes impliqués dans la maladie et tente de découvrir ceux-ci à travers un criblage systématique du génome. La méthode la plus utilisée pour les maladies génétiques complexes repose sur l'étude de l'identité par la descendance des malades d'une même famille. Cette valeur est calculée pour un grand nombre (300-

400) de marqueurs de polymorphisme répartis régulièrement (tous les 10cM) sur le génome. En cas d'excès d'identité entre malades, le(s) marqueur(s) testé(s) indique(nt) une région supposée contenir un gène de susceptibilité à la maladie. Dans le cas des maladies génétiques complexes, le modèle sous-jacent à la  
5 prédisposition génétique (nombre de gènes et importance respective de chacun d'entre eux) étant inconnu, les méthodes statistiques à utiliser devront être adaptées.

La présente invention concerne la mise en évidence de la séquence nucléique de gènes impliqués dans les MICI, et d'autres maladies inflammatoires, ainsi que l'utilisation de ces séquences nucléiques.

10 Dans le cadre de la présente invention, des travaux préliminaires des inventeurs ont déjà permis de localiser un gène de susceptibilité à la MC. En effet, les inventeurs (Hugot et al., 1996) ont montré qu'un gène de susceptibilité à la MC était localisé dans la région péricentromérique du chromosome 16 (figure 1). Il s'agissait du premier gène de susceptibilité à une maladie génétique complexe  
15 localisé par clonage positionnel et satisfaisant aux critères stricts proposés dans la littérature (Lander et Kruglyak, 1995). Ce gène a été nommé IBD1 (pour Inflammatory Bowel Disease 1). Depuis, d'autres localisations ont été proposées par d'autres auteurs en particulier sur les chromosomes 12, 1, 3, 6 et 7 (Satsangi et al., 1996 ; Cho et al., 1998). Bien que localisés, aucun de ces gènes de susceptibilité  
20 aux MICI n'a actuellement pu être identifié.

Certains auteurs n'ont pu répliquer cette localisation (Rioux et al., 1998). Ceci n'est cependant pas surprenant dans le cas de maladies génétiques complexes où une hétérogénéité génétique est probable.

Il est intéressant de noter que selon la même approche de clonage  
25 positionnel, des localisations ont aussi été proposées sur le chromosome 16 pour plusieurs maladies immunes et inflammatoires telles que la spondylarthrite ankylosante, le syndrome de Blau, le psoriasis, etc. (Becker et al., 1998 ; Tromp et al., 1996). Toutes ces maladies pourraient alors partager un même gène (ou un même groupe de gènes) localisé sur le chromosome 16.

30 Le maximum des tests de liaison génétique est situé pratiquement toujours à la même position, au niveau de D16S409 ou D16S411 séparés seulement de 2cM. Ce résultat est en opposition avec la taille importante (habituellement supérieure à

20cM) de l'intervalle de confiance attribuable à la localisation génétique selon une démarche utilisant des analyses de liaison non paramétriques.

La comparaison des tests statistiques utilisés dans les travaux des inventeurs montre que les tests basés sur l'identité par descendance complète (Tz2) sont  
5 meilleurs que les tests basé sur la moyenne de l'identité par descendance (Tz) (fig. 1). Une telle différence peut être expliquée par un effet récessif de IBD1.

Plusieurs gènes connus dans la région péricentromérique du chromosome 16, tels que le récepteur à l'interleukine 4, CD19, CD43, CD11, apparaissent comme de bons candidats potentiels pour la MC. Des résultats préliminaires ne plaident  
10 cependant pas en faveur de l'implication de ces gènes dans la MC.

En particulier, la présente invention fournit la séquence non seulement du gène IBD1, mais également la séquence partielle d'un autre gène, appelé IBD1prox en raison de sa localisation à proximité d'IBD, et mis en évidence comme rapporté dans les exemples ci-après. Ces gènes dont la séquence d'ADNc correspond  
15 respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 4 sont donc potentiellement impliqués dans de nombreuses maladies inflammatoires et/ou immunes ainsi que dans des cancers.

La séquence peptidique exprimée par les gènes IBD1 et IBD1prox est représentée par SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 5 respectivement; la séquence  
20 génomique de ces gènes est représentée par SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 6 respectivement.

Ainsi, la présente invention a pour objet un acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :

- 25
- a) SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 6 ;
  - b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 ou SEQ ID N° 6 ;
  - c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité  
30 d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;
  - d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) ;

e) la séquence complémentaire ou la séquence de l'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).

La séquence d'acides nucléiques selon l'invention définie en c) présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec une  
5 séquence telle que définie en a) ou b) ci-dessus, de préférence 90 %, de façon la plus préférée 98 %.

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente  
10 description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADNs. Ainsi, les séquences nucléiques selon l'invention englobent  
15 également les PNA (Peptid Nucleic Acid), ou analogues.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur  
20 environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux  
25 séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux  
30 séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement

optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au  
5 moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

10 Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage  
15 d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

20 Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement,  
25 une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences SEQ ID N° 1 ou  
30 SEQ ID N° 4 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 % d'identité après alignement optimal entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec la séquence selon l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N° 1, ou de SEQ ID N° 4, ou de leurs fragments, c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléiques correspondant à des variants alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles des séquences SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4. Ces séquences mutées naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment, à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une pathologie. De préférence, la présente invention concerne les séquences nucléiques variantes dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence d'acides aminés du polypeptide, ou de ses fragments, codés par la séquence normale de SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4.



On entend également désigner par séquence nucléique variante tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou variation d'un site d'épissage de la séquence nucléique génomique dont l'ADNc a pour séquence SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4.

5 L'invention concerne de préférence un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de l'une des séquences SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4, de leurs séquences complémentaires ou des séquences de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4.

Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon l'invention, font également partie de  
10 l'invention.

Ainsi, la présente invention concerne également les amorces ou les sondes selon l'invention qui peuvent permettre en particulier de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique des gènes dont l'ADNc est représenté par SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N°  
15 4, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme sonde ou amorce, pour la détection, l'identification, le dosage ou l'amplification de séquence d'acide nucléique.

20 Selon l'invention, les polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 15 bases, de préférence de 20 bases, ou mieux de 25 à 30 bases.

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement  
25 ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les séquences de polynucléotides selon l'invention non marquées peuvent être utilisées directement comme sonde ou amorce.

30 Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives.

Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{33}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$ , le  $^3\text{H}$  ou le  $^{125}\text{I}$ . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, 5 bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en oeuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (Rolfs et al., 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment 10 qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4,683,202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La spécificité de 15 l'amplification peut être contrôlée en utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention et comme matrices, des plasmides contenant ces séquences ou encore les produits d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon 20 biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés.

L'invention vise également les acides nucléiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être 25 avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes mettant en oeuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En 30 général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription reverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement

Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992), la technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwoh et al. (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli et al. (1990), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis et al. (1991), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren et al. (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck et al. (1990), la technique d'amplification à la Q-béta-réplique décrite par Miele et al. (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantagusement, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) et à incubé, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en oeuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement détectable.

Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut ainsi citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction  
5 avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

La présente invention concerne également un polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 ;
- 10 b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;
- 15 d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a) , b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

Par « polypeptide », on entend, au sens de la présente invention, désigner  
20 des protéines ou des peptides.

Par « fragment biologiquement actif », on entend un fragment possédant la même activité biologique que le fragment peptidique dont il est déduit, de préférence dans le même ordre de grandeur (à un facteur 10 près). Ainsi, les exemples montrent que la protéine IBD1 (SEQ ID N° 2) a un rôle potentiel dans les  
25 phénomènes d'apoptose. Un fragment biologiquement actif de la protéine IBD1 consiste donc en un polypeptide issu de SEQ ID N° 2 possédant également un rôle dans l'apoptose. Les exemples ci-après proposent des fonctions biologiques pour les protéines IBD1 et IBD1prox, en fonction des domaines peptidiques de ces protéines et permettent ainsi à l'homme du métier d'identifier les fragments biologiquement  
30 actifs.

De préférence un polypeptide selon l'invention est un polypeptide constitué de la séquence SEQ ID N° 2 (correspondant à la protéine codée par le gène IBD1) ou de la séquence SEQ ID N° 5 (correspondant à la protéine codée par IBD1prox)

ou d'une séquence possédant au moins 80 % d'identité avec SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 après alignement optimal.

La séquence du polypeptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %.

Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de référence, comme en particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou avec l'un de leurs fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés par les séquences nucléiques variantes telles que précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport aux séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou avec l'un de leurs fragments, de manière plus préférée les polypeptides variants présentant une mutation liée à une pathologie.

La présente invention concerne également les vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique ou codant pour un polypeptide selon l'invention. Un tel vecteur peut également contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion du polypeptide dans une cellule hôte. Une telle cellule hôte est également un objet de l'invention.

Les vecteurs caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence de promoteur et/ou de régulateur selon l'invention, font également partie de l'invention.

Lesdits vecteurs comportent de préférence un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable

dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention  
5 peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral, les vecteurs viraux pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des  
10 rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou  
15 viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les  
20 chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

25 De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

30 L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention ainsi que les animaux transgéniques, de préférence les mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. Ces animaux

peuvent être utilisés en temps que modèles, pour l'étude de l'étiologie de maladies inflammatoires et/ou immunes, et en particulier des maladies inflammatoires du tube digestif, ou pour l'étude de cancers.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer  
5 les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais aussi les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). On peut citer également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en œuvre des  
10 baculovirus (Luckow, 1993). Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des protéines de l'invention est constitué par les cellules COS.

Parmi les mammifères selon l'invention, on préfère des animaux tels que les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins, exprimant un polypeptide selon l'invention.

15 Parmi les mammifères selon l'invention, on préfère également des animaux tels que les souris, les rats ou les lapins, caractérisés en ce que le gène codant pour la protéine de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, ou dont la séquence est codée par le gène homologue chez ces animaux, n'est pas fonctionnel, est invalidé ou présente au moins une mutation.

20 Ces animaux transgéniques sont obtenus par exemple par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

Les animaux transgéniques selon l'invention peuvent ainsi surexprimer le  
25 gène codant pour la protéine selon l'invention, ou leur gène homologue, ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation. Ces animaux transgéniques, en particulier des souris, sont obtenus par exemple par transfection de copie de ce gène sous contrôle d'un promoteur fort de nature ubiquitaire, ou sélectif d'un type de tissu, ou après transcription virale.

30 Alternativement, les animaux transgéniques selon l'invention peuvent être rendus déficients pour le gène codant pour l'un des polypeptides de séquences SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, ou leurs gènes homologues, par inactivation à l'aide du

système LOXP/CRE recombinaise (Rohlmann et al., 1996) ou de tout autre système d'inactivation de l'expression de ce gène.

Les cellules et mammifères selon l'invention sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide selon l'invention, comme décrit ci-dessous, et peuvent également servir à titre de modèle d'analyse.

Les cellules ou mammifères transformés tels que décrits précédemment peuvent aussi être utilisés à titre de modèles afin d'étudier les interactions entre les polypeptides selon l'invention, et les composés chimiques ou protéiques, impliqués directement ou indirectement dans les activités des polypeptides selon l'invention, ceci afin d'étudier les différents mécanismes et interactions mis en jeu.

Ils peuvent en particulier être utilisés pour la sélection de produits interagissant avec les polypeptides selon l'invention, notamment la protéine de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 ou leurs variants selon l'invention, à titre de cofacteur, ou d'inhibiteur, notamment compétitif, ou encore ayant une activité agoniste ou antagoniste de l'activité des polypeptides selon l'invention. De préférence, on utilise lesdites cellules transformées ou animaux transgéniques à titre de modèle notamment pour la sélection de produits permettant de lutter contre les pathologies liées à une expression anormale de ce gène.

L'invention concerne également l'utilisation d'une cellule, d'un mammifère ou d'un polypeptide selon l'invention pour le criblage de composés chimiques ou biochimiques pouvant interagir directement ou indirectement avec les polypeptides selon l'invention, et/ou capable de moduler l'expression ou l'activité de ces polypeptides.

De la même façon, l'invention concerne aussi un procédé de criblage de composés capables d'interagir *in vitro* ou *in vivo* avec un acide nucléique selon l'invention, en utilisant un acide nucléique une cellule ou un mammifère selon l'invention, et en détectant la formation d'un complexe entre les composés candidats et l'acide nucléique selon l'invention.

Les composés ainsi sélectionnés sont également objets de l'invention.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention pour la synthèse de polypeptides recombinants.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce



que l'on cultive les cellules transformées, notamment les cellules ou mammifères de la présente invention, dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

- 5 Les polypeptides recombinants, caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par ladite méthode de production, font également partie de l'invention.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent  
10 présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

Les séquences des polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en particulier dans les solvants aqueux.

De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés  
15 hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression  
20 dans un hôte cellulaire.

Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte selon l'invention.

Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis  
25 la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des  
30 méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment Stewart et al., 1984) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par  
5 condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique.

Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de  
10 reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention, font partie de l'invention.

Des anticorps polyclonaux spécifiques peuvent être obtenus à partir d'un sérum d'un animal immunisé contre les polypeptides selon l'invention, notamment produit par recombinaison génétique ou par synthèse peptidique, selon les modes  
15 opératoires usuels.

On note notamment l'intérêt d'anticorps reconnaissant de façon spécifique certains polypeptides, variants, ou leurs fragments immunogènes, selon l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de  
20 reconnaître spécifiquement les polypeptides de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 sont particulièrement préférés.

Les anticorps monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (1975).

Les anticorps selon l'invention sont, par exemple, des anticorps  
25 chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub>. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent  
30 en œuvre un anticorps selon l'invention.

L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

5 Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des polypeptides selon l'invention, notamment les polypeptides de séquence SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou l'un de leurs variants, sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immuno-conjugués enzymatiques.

10 Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces polypeptides dans les tissus ou prélèvements biologiques.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en œuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention, normal ou muté, doit être observée.

15 Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé est également un objet de l'invention, ainsi qu'une trousse permettant de mettre en œuvre un tel procédé. Une telle trousse contient en  
20 particulier :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'invention ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-  
25 anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Les anticorps selon l'invention peuvent également être utilisés dans le traitement d'une maladie inflammatoire et/ou immune, ou d'un cancer, chez l'homme, lorsque l'on observe une expression anormale du gène IBD1 ou du gène IBD1prox. Une expression anormale signifie une surexpression ou l'expression  
30 d'une protéine mutée.

Ces anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain, ou à partir d'animaux immunisés avec des polypeptides selon l'invention, puis

« humanisés », et peuvent être utilisés tels quels ou dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies précitées.

Font également partie de l'invention, les méthodes de détermination d'une variabilité allélique, d'une mutation, d'une délétion, d'une perte d'hétérozygotie ou  
5 de toute anomalie génétique du gène selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en oeuvre une séquence d'acide nucléique, un polypeptide ou un anticorps selon l'invention.

L'invention fournit en effet la séquence des gènes IBD1 et IBD1prox impliqués dans des maladies inflammatoires et/ou immunes, et en particulier les  
10 MICI. Un des enseignements de l'invention est de préciser les mutations dans ces séquences nucléiques ou polypeptidiques, qui sont liées à un phénotype correspondant à une des ces maladies inflammatoires et/ou immunes.

On peut détecter ces mutations directement par analyse de l'acide nucléique et des séquences selon l'invention (ADN génomique, ARN, ou ADNc), mais  
15 également par l'intermédiaire des polypeptides selon l'invention. En particulier, l'utilisation d'un anticorps selon l'invention qui reconnaît un épitope portant une mutation permet de discriminer entre une protéine « saine » et une protéine « associée à une pathologie ».

Ainsi, l'étude du gène IBD1 dans diverses maladies inflammatoires et/ou  
20 immunes humaines montre ainsi qu'il existe des variants de séquence de ce gène dans la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique et le syndrome de Blau, comme démontré par les exemples. Ces variations de séquence aboutissent à des variations importantes de la séquence protéique déduite. En effet, elles sont soit localisées sur des sites très conservés de la protéine dans des domaines fonctionnels  
25 importants, soit elles aboutissent à la synthèse d'une protéine tronquée. Il est donc extrêmement probable que ces altérations entraînent une modification de la fonction de la protéine et aient donc un effet causal dans la survenue de ces maladies.

La variété des maladies où sont observées ces mutations suggère que le gène IBD1 est potentiellement important dans de nombreuses maladies inflammatoires  
30 et/ou immunes. Ce résultat est à rapprocher du fait que la région péricentromérique du chromosome 16 a été décrite comme contenant des gènes de susceptibilité à diverses maladies humaines telles que la spondylarthrite ankylosante ou le

rhumatisme psoriasique. On peut donc considérer qu'IBD1 a un rôle important dans un grand nombre de maladies inflammatoires et/ou immunes.

En particulier, on peut associer IBD1 aux maladies inflammatoires granulomateuses. En effet, le Syndrome de Blau et la MC sont des maladies faisant  
5 partie de cette famille. On espère donc trouver des variations dans le gène IBD1 pour les autres maladies de la même famille (sarcoïdose, maladie de Behçet...).

De plus, l'implication de IBD1 dans les voies cellulaires aboutissant à l'apoptose soulève la question de son éventuel rôle carcinogène. En effet, il est attendu qu'une dysrégulation de IBD1 puisse aboutir à une prédisposition  
10 cancéreuse. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il existe une prédisposition au cancer du colon dans les maladies inflammatoires de l'intestin. IBD1 pourrait en partie expliquer cette susceptibilité au cancer et définir de nouvelles voies de carcinogenèse.

La description précise des mutations observables dans le gène IBD1 permet  
15 ainsi de poser les bases d'un diagnostic moléculaire des maladies inflammatoires et immunes où son rôle est démontré. Une telle démarche, basée sur la recherche de mutations dans le gène, permettra de contribuer au diagnostic de ces maladies et éventuellement de réduire l'importance de certains examens complémentaires invasifs ou coûteux. L'invention pose les bases d'un tel diagnostic moléculaire basé  
20 sur la recherche de mutations dans IBD1.

Le diagnostic moléculaire des maladies inflammatoires devrait aussi permettre d'améliorer la classification nosologique de ces maladies et de mieux définir des sous-groupes de malades particuliers par leur caractéristiques cliniques, l'évolutivité de la maladie ou la réponse à certains traitements. A titre d'exemple, le  
25 démantèlement des mutations existantes pourrait ainsi permettre de classer les colites actuellement indéterminées qui représentent plus de 10% des maladies inflammatoires de l'intestin. Une telle démarche permettra de proposer une prise en charge précoce adaptée à chaque patient. D'une manière générale, une telle démarche permet d'espérer pouvoir définir à terme une prise en charge  
30 individualisée de la maladie, en fonction du terrain génétique de chaque malade, incluant des mesures curatives et préventives.

En particulier, on préfère une méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique d'une maladie inflammatoire ou d'un cancer caractérisée en ce qu'on

détermine à partir d'un prélèvement biologique d'un patient la présence d'au moins une mutation et/ou une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4 par l'analyse de tout ou partie d'une séquence nucléique correspondant audit gène. On peut aussi étudier les gènes SEQ ID N° 3 ou SEQ ID 5 N° 6.

Cette méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique peut être utilisée de façon préventive (étude d'une prédisposition à ces maladies inflammatoires ou au cancer), ou afin de servir à l'établissement et/ou la confirmation d'un état clinique chez un patient.

10 De préférence, la maladie inflammatoire est une maladie inflammatoire du tube digestif, et le cancer est un cancer du tube digestif (intestin grêle ou colon).

L'enseignement de l'invention permet en effet de connaître les mutations présentant un déséquilibre de liaison avec les maladies inflammatoires du tube digestif, et qui sont donc associées à de telles maladies.

15 L'analyse peut être effectuée par séquence de tout ou partie du gène, ou par d'autres méthodes connues de l'homme du métier. On peut en particulier utiliser des méthodes basées sur la PCR, par exemple la PCR-SSCP qui permet de détecter des mutations ponctuelles.

On peut également effectuer l'analyse par fixation d'une sonde selon 20 l'invention correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1, 3, 4 ou 6 sur une puce à ADN et l'hybridation sur ces microplaques. Une puce à ADN contenant une séquence selon l'invention est également un des objets de l'invention.

De même, une puce à protéines contenant une séquence d'acides aminés selon l'invention est aussi un objet de l'invention. Une telle puce à protéines permet 25 l'étude des interactions entre les polypeptides selon l'invention et d'autres protéines ou des composés chimiques, et peut ainsi être utile pour le criblage de composés interagissant avec les polypeptides selon l'invention. On peut également utiliser les puces à protéines selon l'invention pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre les polypeptides selon l'invention dans le sérum de patients. On peut aussi 30 mettre en œuvre une puce à protéines contenant un anticorps selon l'invention.

L'homme du métier sait également mettre en œuvre des techniques permettant l'étude de l'altération de l'expression d'un gène, par exemple par l'étude de l'ARNm (en particulier par Northern Blot ou par des expériences de RT-PCR,

avec des sondes ou des amorces selon l'invention), ou de la protéine exprimée, en particulier par Western Blot, en utilisant des anticorps selon l'invention.

Le gène testé est de préférence le gène de séquence SEQ ID N° 1, la maladie inflammatoire pour laquelle on cherche à prédire la susceptibilité étant une maladie du tube digestif, en particulier la maladie de Crohn, ou la rectocolite hémorragique. Si l'on cherche à détecter un cancer, il s'agit de préférence du cancer du colon.

L'invention se rapporte également à des procédés d'obtention d'un allèle du gène IBD1, associé à un phénotype détectable, comprenant les étapes suivantes :

- a) obtenir un échantillon d'acide nucléique d'un individu exprimant ledit phénotype détectable ;
- b) mettre en contact ledit échantillon d'acide nucléique avec un agent capable de détecter spécifiquement un acide nucléique codant pour la protéine IBD1 ;
- c) isoler ledit acide nucléique codant pour la protéine IBD1.

Un tel procédé peut être suivi d'une étape de séquence de tout ou partie de l'acide nucléique codant pour la protéine IBD1, ce qui permet de prédire la susceptibilité à une maladie inflammatoire ou d'un cancer.

L'agent capable de détecter spécifiquement un acide nucléique codant pour la protéine IBD1 est avantageusement une sonde d'oligonucléotides selon l'invention, qui peut être formée d'ADN, d'ARN, de PNA, modifiés ou non. Les modifications peuvent inclure un marquage radioactif ou fluorescent, ou être dues à des modifications dans les liaisons entre les bases (phosphorothioates, ou méthylphosphonates par exemple). L'homme du métier connaît les protocoles permettant d'isoler une séquence spécifique d'ADN. L'étape b) du procédé ci-dessus décrit peut également être une étape d'amplification telle que décrite précédemment.

L'invention se rapporte également à un procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes de mise en contact d'une sonde selon l'invention avec un échantillon biologique et de détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

L'homme du métier sait mettre en œuvre un tel procédé, et peut en particulier utiliser une trousse de réactifs comprenant :

- a) un polynucléotide selon l'invention, utilisé en tant que sonde ;
- b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
- 5 c) les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

qui est également un objet de l'invention.

Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs  
10 afin d'assurer la qualité des résultats obtenus.

Toutefois, afin de détecter et/ou doser un acide nucléique selon l'invention, l'homme du métier peut également effectuer une étape d'amplification à l'aide d'amorces choisies parmi les séquences selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne également les composés choisis parmi un acide  
15 nucléique, un polypeptide, un vecteur, une cellule, ou un anticorps selon l'invention, ou les composés obtenus par les procédés de criblage selon l'invention, à titre de médicament, en particulier pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie inflammatoire et/ou immune ou d'un cancer, associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 4, de  
20 préférence une maladie inflammatoire du tube digestif, en particulier la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique.

Les exemples qui suivent permettent de mieux comprendre les avantages de l'invention et ne doivent pas être considérés comme limitant la portée de l'invention.

## 25 DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : tests de liaison génétique non paramétrique pour la maladie de Crohn dans la région péricentromérique du chromosome 16 (d'après Hugot et al., 1996). Analyse de liaison multipoint basé sur l'identité par descendance pour les marqueurs de la région péricentromérique du chromosome 16. Les distances  
30 génétiques entre marqueurs ont été estimées grâce au programme CRIMAP. Le lod score (MAPMAKER/SIBS) est indiqué sur la figure de gauche. Deux tests de pseudo vraisemblance ont été développés et rapportés sur la figure de droite. Le



premier (Tz) est analogue au test des moyennes. Le deuxième (Tz2) est analogue au test de la proportion des paires d'affectés partageant deux allèles.

**Figure 2** : analyse de liaison génétique multipoint non paramétrique. 78 familles avec plusieurs apparentés atteints de Maladie de Crohn ont été génotypées pour 26 marqueurs de polymorphisme dans la région péricentromérique du chromosome 16. La localisation de chaque marqueur est symbolisée par une flèche. L'ordre des marqueurs et la distance les séparant dérive de l'analyse des données expérimentales avec le logiciel Crimap. Les flèches sous la courbe indiquent les marqueurs SPN, D16S409 et D16S411 utilisés dans la première étude publiée (Hugot et al., 1996). Les flèches situées en haut de la figure correspondent aux marqueurs D16S3136, D16S541, D16S3117, D16S416 et D16S770 localisés au maximum du test de liaison génétique. Les données de typage ont été analysées à l'aide du programme d'analyse multipoint non paramétrique du logiciel Genehunter version 1.3. Le maximum du NPL Score est de 3,33 ( $p=0,0004$ ).

**Figure 3** : représentation schématique de la protéine codée par IBD1. La protéine codée par IBD1 est représentée horizontalement. Les différents domaines qui la composent sont indiqués sur la figure avec le numéro de référence des acides aminés correspondant au début et à la fin de chaque domaine. La protéine est constituée d'un domaine CARD, d'un domaine liant les nucléotides (NBD) et de motifs riches en leucines (LRR).

### EXEMPLES

#### Exemple 1 : localisation fine de IBD1

La première étape vers l'identification du gène IBD1 a été de réduire la taille de la région génétique d'intérêt, initialement centrée sur le marqueur D16S411 situé entre D16S409 et D16S419 (Hugot et al., 1996 et fig. 1). Un groupe de marqueurs proches (carte génétique à haute résolution) a été utilisé pour mieux préciser la région génétique et a permis de compléter les analyses de liaison génétique et de rechercher un déséquilibre de liaison génétique avec la maladie.

L'étude a porté sur 78 familles comportant au moins 2 apparentés atteints de MC, qui correspondaient à 119 paires d'affectés. Les familles comportant des malades atteints de RCH ont été exclues de l'étude.

Vingt-six marqueurs génétiques de polymorphisme de type microsatellites ont été étudiés. Ces marqueurs formaient ensemble une carte à haute résolution avec

une distance moyenne entre marqueurs de l'ordre de 1cM dans la région génétique d'intérêt. Les caractéristiques des marqueurs étudiés sont rapportés sur le tableau 1.

Tableau 1. Marqueurs polymorphes de type microsatellite utilisés pour la

5 localisation fine de IBD1

Nom du marqueur de polymorphisme	Distance cumulée (cM)	Amorces PCR
D16S3120 (AFM326vc5)	0	SEQ ID N° 7 SEQ ID N° 8
D16S298 (AFMa189wg5)	2,9	SEQ ID N° 9 SEQ ID N° 10
D16S299	3,4	SEQ ID N° 11 SEQ ID N° 12
SPN	3,9	SEQ ID N° 13 SEQ ID N° 14
D16S383	4,3	SEQ ID N° 15 SEQ ID N° 16
D16S753 (GGAA3G05)	4,9	SEQ ID N° 17 SEQ ID N° 18
D16S3044 (AFMa222za9)	5,8	SEQ ID N° 19 SEQ ID N° 20
D16S409 (AFM161xa1)	5,8	SEQ ID N° 21 SEQ ID N° 22
D16S3105 (AFMb341zc5)	6,1	SEQ ID N° 23 SEQ ID N° 24
D16S261 (MFD24)	6,8	SEQ ID N° 25 SEQ ID N° 26
D16S540 (GATA7B02)	6,9	SEQ ID N° 27 SEQ ID N° 28
D16S3080 (AFMb068zb9)	7	SEQ ID N° 29 SEQ ID N° 30
D16S517 (AFMa132we9)	7	SEQ ID N° 31 SEQ ID N° 32
D16S411 (AFM186xa3)	8	SEQ ID N° 33 SEQ ID N° 34
D16S3035 (AFMa189wg5)	10,4	SEQ ID N° 35 SEQ ID N° 36
D16S3136 (AFMa061xe5)	10,4	SEQ ID N° 37 SEQ ID N° 38
D16S541 (GATA7E02)	11,4	SEQ ID N° 39 SEQ ID N° 40
D16S3117 (AFM288wb1)	11,5	SEQ ID N° 41 SEQ ID N° 42
D16S416 (AFM210yg3)	12,4	SEQ ID N° 43 SEQ ID N° 44

D16S770 (GGAA20G02)	13,2	SEQ ID N° 45 SEQ ID N° 46
D16S2623 (GATA81B12)	15	SEQ ID N° 47 SEQ ID N° 48
D16S390	16,5	SEQ ID N° 49 SEQ ID N° 50
D16S419 (AFM225zf2)	20,4	SEQ ID N° 51 SEQ ID N° 52
D16S771 (GGAA23C09)	21,8	SEQ ID N° 53 SEQ ID N° 54
D16S408 (AFM137xf8)	25,6	SEQ ID N° 55 SEQ ID N° 56
D16S508 (AFM304xf1)	38,4	SEQ ID N° 57 SEQ ID N° 58

Chaque marqueur est répertorié selon la nomenclature internationale et le plus souvent par le nom proposé par le laboratoire d'origine. Les marqueurs apparaissent selon leur ordre sur le chromosome (de 16p vers 16q). La distance génétique entre les marqueurs (en centiMorgan Kosambi, calculée par le programme Crimap à partir des données expérimentales) est indiquée dans la deuxième colonne. Le premier marqueur polymorphe est pris arbitrairement comme point de référence. Les oligonucléotides ayant servi à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont indiqués dans la troisième colonne.

Le génotypage de ces marqueurs microsatellites a reposé sur la technologie des séquenceurs automatiques utilisant des amorces fluorescentes. Brièvement, après amplification, les produits de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) fluorescents ont été déposés sur un gel de polyacrylamide sur séquenceur automatique selon les recommandations du constructeur (Perkin Elmer). La taille des allèles pour chaque sujet a été déduite grâce au logiciels Genescan<sup>R</sup> et Genotyper<sup>R</sup>. Les données ont ensuite été conservées sur une base informatique intégrée contenant les données généalogiques, phénotypiques et génétiques. Elles ont alors été utilisées pour les analyses de liaison génétique.

Plusieurs contrôles qualité ont été réalisés tout au long de la procédure de génotypage:

- double lecture indépendante des données de génotypage,
- utilisation d'un ADN standard servant de contrôle interne pour chaque migration électrophorétique,
- contrôle de la gamme de taille de chaque allèle observé,

- recherche d'erreurs de transmission mendélienne ,
- calcul de la distance génétique entre marqueurs (programme CRIMAP) et comparaison de celle-ci avec les données de la littérature,
- nouveau typage des marqueurs pour lesquels il était observé une recombinaison entre marqueurs proches.

Les données de génotypage ont été analysées par des méthodes de liaison génétique multipoint non paramétrique (Programme GENEHUNTER version 1.3). L'informativité du système de marqueurs était supérieure à 80% pour la région étudiée. Le maximum du test (NPL= 3,33;  $P = 0,0004$ ) a été obtenu pour les marqueurs D16S541, D16S3117, D16S770 et D16S416 (figure 2).

Les données de typage pour ces 26 marqueurs de polymorphisme ont aussi été analysées à la recherche d'un déséquilibre de transmission. Deux groupes de 108 et 76 familles avec un ou plusieurs malades atteints de MC ont été étudiés. Le test statistique de déséquilibre de transmission a été décrit par Spielman et al. (1993). Il n'a été pris en compte dans ce travail qu'un seul malade par famille et la valeur de  $p$  a été corrigée par le nombre d'allèles testés pour chaque marqueur étudié.

Un déséquilibre de transmission a été observé pour les allèles 4 et 5 (taille 205, resp. 207 paires de bases) du marqueur D16S3136 ( $p=0,05$ , resp.  $p=0,01$ ).

Ces résultats suggestifs d'une association entre le marqueur D16S3136 et la MC ont conduit à construire une cartographie physique de la région génétique centrée sur D16S3136 et à établir la séquence d'un segment d'ADN génomique de grande taille (BAC) contenant ce site polymorphe. Il a alors été possible d'identifier et d'analyser un plus grand nombre de marqueurs de polymorphisme dans le voisinage de D16S3136 ainsi que de définir et d'étudier les séquences transcrites présentes dans la région.

#### Exemple 2 : cartographie physique de la région IBD1

Un contig de fragments d'ADN génomique, centré sur les marqueurs D16S3136, D16S3117, D16S770 et D16S416, a été généré à partir des banques d'ADN génomique humain de la fondation Jean Dausset/CEPH. Les segments d'ADN chromosomique ont été identifiés à partir de certains marqueurs de polymorphisme utilisés dans la cartographie génétique fine (D16S411, D16S416, D16S541, D16S770, D16S2623, D16S3035, D16S3117 et D16S3136). Pour chaque

marqueur, une banque de chromosomes artificiels de bactéries (BAC) a été criblée par PCR à la recherche de clones contenant la séquence du marqueur. Selon que les séquences testées étaient ou non présentes sur les clones de BAC il a été alors possible d'organiser les clones entre eux à l'aide du logiciel Segmap version 3.35.

- 5           On a pu établir, pour les BACs, une organisation continue (contig) couvrant la région génétique d'intérêt, selon une méthode connue de l'homme du métier (Rouquier et al., 1994 ; Kim et al., 1996 ; Asakawa et al., 1997). Pour ce faire, les extrémités des BACs identifiés ont été séquencées et ces nouvelles données de séquence ont alors servi à cribler itérativement les banques de BACs. A chaque
- 10   criblage, le contig de BAC a alors progressé d'un pas jusqu'à l'obtention d'un continuum de clones chevauchants. La taille de chaque BAC participant au contig a été déduite de son profil de migration sur gel d'agarose en champ pulsé.

- On a ainsi construit un contig de BAC contenant 101 BACs et s'étendant sur une distance globale de plus de 2,5 Mb avec une redondance moyenne de 5,5 BAC
- 15   à chaque point du contig. La taille moyenne des BAC est de 136kb.

### Exemple 3 : séquençage du BAC hb87b10

- Le BAC de ce contig contenant le marqueur de polymorphisme D16S3136 (appelé hb87b10), dont la taille était de 163761 bp a été séquencé selon la méthode
- 20   dite du "coup de fusil". En bref, l'ADN du BAC a été fragmenté par sonication. Les fragments d'ADN ainsi générés ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose et ceux dont la taille était supérieure à 1,5 kb ont été élus pour être analysés. Ces fragments ont ensuite été clonés dans le phage m13 lui même introduit dans des bactéries rendues compétentes par électroporation. Après culture, l'ADN des clones
- 25   a été récupéré et séquencé par des méthodes de séquençage automatique à l'aide d'amorces fluorescentes du vecteur m13 sur séquenceur automatique.

- 1526 séquences différentes d'une taille moyenne de 600 bp ont été générées, qui ont été organisées entre elles grâce au logiciel Polyphredphrap<sup>R</sup> aboutissant à un contig de séquence couvrant l'ensemble du BAC. La séquence ainsi générée avait
- 30   une redondance moyenne de 5,5 équivalents génomiques. Les rares (n=5) intervalles de séquence non représentés dans la banque de clones m13 ont été comblés en générant des amorces de PCR spécifiques, de part et d'autre de ces

intervalles, et en analysant le produit de PCR dérivé de l'ADN génomique d'un sujet sain.

Des homologies de séquence avec des séquences disponibles dans les bases de données génétiques publiques (Genbank) ont été recherchées. Aucun gène connu n'a pu être identifié dans cet intervalle de 163 kb. Plusieurs EST ont été positionnés suggérant que des gènes inconnus étaient contenus dans cette séquence. Ces EST issus des bases de données génétiques publiques (Genbank, GDB, Unigene, dbEST) portaient les références suivantes : AI167910, AI011720, Rn24957, Mm30219, hs132289, AA236306, hs87296, AA055131, hs151708, AA417809, AA417810, hs61309, hs116424, HUMGS01037, AA835524, hs105242, SHGC17274, hs146128, hs122983, hs87280 et hs135201. La recherche d'exons putatifs à l'aide du programme informatique GAIL a permis d'identifier plusieurs exons potentiels, sites de polyadénylation et séquences promotrices.

#### 15 Exemple 4 : études de déséquilibre de transmission

12 marqueurs de polymorphisme bialléliques (SNP) ont été identifiés dans une région s'étendant sur environ 250 kb et centrée sur le BAC hb87b10. Ces polymorphismes ont été générés par analyse de la séquence d'une dizaine de malades indépendants atteints de MC. Le séquençage a été le plus souvent réalisé au niveau d'EST connus et positionnés sur le BAC ou à son voisinage. Des exons putatifs, prédits par le programme informatique GAIL ont aussi été analysés. Les caractéristiques des marqueurs polymorphes ainsi identifiés sont rapportées sur le tableau 2.

25 Tableau 2. Caractéristiques de marqueurs de polymorphisme bialléliques étudiés dans la région de IBD1

I	II	III	IV	V	VI
1	KIAA0849ex9	PCR-AS		SEQ ID N° 88 à 90	116
2	hb27G11F	PCR-RFLP	<i>BsrI</i>	SEQ ID N° 86, 87	185 116 69
3	Ctg22Ex1	PCR-RFLP	<i>RsaI</i>	SEQ ID N° 84, 85	381 313

					69
4	SNP1	PCR-AS		SEQ ID N° 81 à 83	410
5	ctg2931-3ac/ola	LO		SEQ ID N° 78 à 80	51 49
6	ctg2931-5ag/ola	LO		SEQ ID N° 75 à 77	44 42
7	SNP3-2931	PCR-AS		SEQ ID N° 72 à 74	245
8	Ctg25Ex1	PCR-RFLP	<i>Bst</i> II	SEQ ID N° 70, 71	207 122 85
9	CTG35 ExA	PCR-AS		SEQ ID N° 67 à 69	333
10	ctg35 ExC	PCR-AS		SEQ ID N° 64 à 66	198
11	D16S3136			SEQ ID N° 37, 38	
12	hb133D1f	PCR-RFLP	<i>Taq</i> I	- SEQ ID N° 62, 63	369 295 74
13	D16S3035			SEQ ID N°35, 36	
14	ADCY7 int7	PCR-AS		SEQ ID N° 59 à 61	140

PCR-AS : PCR-allèle spécifique ; LO : Ligature d'oligonucléotides

Les 12 marqueurs de polymorphisme bialléliques nouvellement décrits dans ce travail sont répertoriés dans ce tableau. Pour chacun d'eux sont indiqués :

- le locus (colonne I)
- le nom (colonne II)
- la technique de génotypage utilisée (colonne III)
- l'enzyme de restriction éventuellement utilisée (colonne IV)
- les amorces oligonucléotidiques utilisées pour la réaction de polymérisation en chaîne ou pour la ligature (colonne V)
- la taille des produits attendus lors du typage (colonne VI)

199 familles comportant 1 ou plusieurs malades atteints de MC ont été typées pour ces 12 marqueurs de polymorphisme ainsi que pour les marqueurs D16S3035 et D16S3136 localisés sur le BAC hb87b10. Les familles comportant des malades atteints de RCH n'ont pas été prises en compte. Les méthodes de typage

des polymorphismes étudiés ont été variables en fonction du type de polymorphisme faisant appel à :

- 5           - la technique de PCR-RFLP (amplification suivie de digestion enzymatique du produit de PCR) quand le polymorphisme était situé sur un site de restriction enzymatique.
- PCR avec amorces spécifiques du site polymorphe : amplification différentielle des deux allèles en utilisant des amorces spécifiques de chaque allèle.
- 10          - Test de ligation d'oligonucléotides : ligation différentielle utilisant des oligonucléotides spécifiques de chaque allèle, suivie d'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les données de typage ont ensuite été analysées selon un test de déséquilibre de transmission (programme informatique TDT du logiciel GENEHUNTER version 2). Pour les familles comportant plusieurs apparentés atteints, un seul malade a été  
15 pris en compte pour l'analyse. En effet, la prise en compte de plusieurs malades apparentés pose le problème de non indépendance des données dans les calculs statistiques et peut induire une inflation de la valeur du test. Le malade servant à l'analyse a été tiré au sort au sein de chaque famille par une procédure automatique de randomisation. Compte tenu de cette randomisation, la valeur du test statistique  
20 obtenu ne représentait qu'un seul échantillon possible issu du groupe de familles étudiées. Afin de ne pas limiter l'analyse à ce seul échantillon possible et pour mieux appréhender la robustesse des résultats obtenus, pour chaque test, une centaine d'échantillons aléatoires ont ainsi été générés et analysés.

Les marqueurs ont été étudiés séparément puis groupés selon leur ordre sur  
25 le segment chromosomique (KIAA0849ex9 (locus 1), hb27G11F (locus 2), Ctg22Ex1 (locus 3), SNP1 (locus 4), ctg2931-3ac/ola (locus 5), ctg2931-5ag/ola (locus 6), SNP3-2931 (locus 7), Ctg25Ex1 (locus 8), CTG35ExA (locus 9), ctg35ExC (locus 10), d16s3136 (locus 11), hb133D1f (locus 12), D16S3035 (locus 13), ADCY7int7 (locus 14)) (tableau 2). Les haplotypes comportant 2, 3 et 4  
30 marqueurs consécutifs ont ainsi été analysés en utilisant toujours la même stratégie (100 échantillons aléatoires en prenant pour chaque famille un seul individu atteint).

Pour chaque échantillon testé, il n'a été pris en compte que les génotypes (ou haplotypes) portés par au moins 10 chromosomes parentaux. En moyenne 250 tests



différents ont ainsi été réalisés pour chaque échantillon. Il a alors été possible de déduire le nombre de tests attendus positifs pour chaque seuil de signification et de comparer cette distribution à la distribution observée. Pour les sujets sains, la distribution des tests n'est pas différente de celle attendue selon le hasard ( $\chi^2 = 2,85$ ,  
 5 ddl=4,  $p=0,58$ ). Pour les sujets malades, au contraire, il existe un excès de tests positifs témoignant de l'existence d'un déséquilibre de transmission dans la région étudiée.

Les résultats des tests de déséquilibre de transmission pour chaque marqueur de polymorphisme pris isolément et pour les haplotypes montrant les plus forts  
 10 déséquilibres de transmission ont montré que les marqueurs suivants sont en déséquilibre de liaison avec la maladie: Ctg22Ex1 (locus 3), SNP1 (locus 4), ctg2931-5ag/ola (locus 6), SNP3-2931 (locus 7), Ctg25Ex1 (locus 8) et ctg35ExC (locus 10). Ces marqueurs s'étendent sur une région d'environ 50kb (positions 74736 à 124285 sur la séquence de hb87b10).

15 Les haplotypes les plus fortement associés avec la maladie de Crohn s'étendent eux aussi sur cette région. Ainsi, pour la majorité des échantillons aléatoires, le test de transmission était positif ( $p < 0,01$ ) pour des haplotypes combinant les marqueurs suivants :

- locus 5-6, locus 6-7, locus 7-8, locus 8-9, locus 9-10, locus10-11
- 20 - locus 5-6-7, locus 6-7-8, locus 7-8-9, locus 8-9-10, locus 9-10-11
- locus 5-6-7-8; locus 6-7-8-9, locus 7-8-9-10,

L'haplotype de susceptibilité le plus à risque est défini par les locus 7 à 10. Il s'agit de l'haplotype 1-2-1-2 (tableau 2).

Les marqueurs testés sont, comme attendu, le plus souvent en déséquilibre  
 25 de liaison entre eux.

#### Exemple 6 : Identification du gène IBD1

Les groupements d'EST (références Unigene : Hs 135201, Hs87280, Hs122983, Hs146128, Hs105242, Hs116424, Hs61309, Hs151708, Hs 87296 et  
 30 Hs132289) publiés et présents sur le BAC hb87b10 ont été étudiés à la recherche d'une séquence d'ADN complémentaire (ADNc) plus complète. Pour IBD1prox, les clones disponibles dans les banques publiques ont été séquencés et les séquences organisées entre elles. Pour IBD1, une banque d'ADN complémentaire de sang

périphérique (Stratagene human blood cDNA lambda zapexpress ref 938202) a été criblée par les produits de PCR générés à partir des EST connus selon les modalités proposées par le fabricant. La séquence des ADNc ainsi identifiés a ensuite servi à un nouveau criblage de la banque d'ADNc et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de  
5 l'ADNc présenté.

L'EST hs135201 (UniGene) a permis d'identifier un ADNc ne figurant pas sur les bases de données génétiques disponibles (Genbank) Il correspond donc à un nouveau gène humain. La comparaison de la séquence du cDNA et de l'ADN génomique a montré que ce gène est constitué de 11 exons et 10 introns. Un exon  
10 supplémentaire, en position 5' par rapport au cDNA identifié est prédit par l'analyse de la séquence avec le logiciel Grail. Ces exons sont très homologues avec les premiers exons du gène CARD4/NOD1. Considérant l'ensemble des exons identifiées et l'exon putatif supplémentaire, ce nouveau gène apparaît avoir une structure génomique très proche de celle de CARD4/NOD1. Par ailleurs, en amont  
15 du premier exon putatif figure un site d'initiation de la transcription. Pour l'ensemble de ces raisons, l'exon putatif a été considéré comme participant à ce nouveau gène. L'ADNc reporté en annexe (SEQ ID N° 1) comporte donc l'ensemble de la séquence identifiée plus la séquence prédite par la modélisation informatique, l'ADN complémentaire débutant arbitrairement au premier codon ATG de la  
20 séquence codante prédite. Le gène comporte donc 12 exons et 11 introns. La structure intron-exon du gène est rapportée sur la SEQ ID N° 3.

La séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique, comporte 1041 acides aminés (SEQ ID N° 2). Cette séquence n'a pas non plus été retrouvée sur les bases de données biologiques (Genpept, pir, swissprot).

25 L'étude de la séquence protéique déduite montre que ce gène contient trois domaines fonctionnels différents (figure 3) :

- Un domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) connu pour être impliqué dans l'interaction entre protéines régulatrices de l'apoptose et de l'activation de la voie NFkappa B. Le domaine CARD permet de  
30 classer cette nouvelle protéine dans la famille des protéines CARD dont les membres les plus anciens sont CED 4, APAF1 et RICK.

- Un domaine NBD (Nucléotide Binding Domaine) comportant un site de reconnaissance de l'ATP et un site de liaison du Magnésium. La protéine doit donc avoir une activité kinase très probable.
- Un domaine LRR (Leucine Rich Domain) supposé participer à l'interaction entre protéines par analogie avec d'autres domaines protéiques décrits .

Par ailleurs, le domaine LRR de la protéine permet d'affilier la protéine à une famille de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire et présentes tant chez les plantes que chez les animaux.

- La comparaison de ce nouveau gène avec les gènes précédemment identifiés et disponibles dans les bases de données publiques montre que celui-ci est très homologue avec CARD4/NOD1 (Bertin et al., 1999 ; Inohara et al., 1999). Cette homologie porte sur la séquence de l'ADN complémentaire, la structure intron-exon du gène et la séquence protéique. L'identité de séquence des 2 ADN complémentaires est de 58%. Une similitude est également observée au niveau de la structure introns-exons. L'homologie de séquence au niveau protéique est de l'ordre de 40%.

- La similitude entre ce nouveau gène et CARD4/NOD1 suggère que, comme CARD4/NOD1, la protéine IBD1 est impliquée dans la régulation de l'apoptose et de l'activation de NF-kappa B (Bertin et al., 1999 ; Inohara et al., 1999). La régulation de l'apoptose cellulaire et l'activation de NF-kappa B sont des voies de signalisation intracellulaire essentielles dans les réactions immunitaires. En effet, ces voies de transduction du signal sont les voies effectrices des protéines de la famille du récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor) impliquées dans les interactions cellule-cellule et la réponse cellulaire aux différents médiateurs de l'inflammation (cytokines). Le nouveau gène apparaît donc comme potentiellement important à la réaction inflammatoire, de façon générale.

- L'expression tissulaire de IBD1 a été ensuite étudiée par la technique du Northern Blot. Un transcrit de 4.5 kb est visible dans la plupart des tissus humains. La taille du transcrit est conforme avec la taille prédite par l'ADNc. Le transcrit de 4.5 kb semble en très faible abondance dans l'intestin grêle et le colon. Il est par contre très fortement exprimé dans les globules blancs. Ceci est en accord avec des données cliniques sur les transplantations qui suggèrent que la maladie de Crohn est

potentiellement une maladie liée aux cellules immunitaires circulantes. En effet, la transplantation intestinale n'empêche pas la récurrence sur le greffon dans la maladie de Crohn tandis que la transplantation de moelle osseuse semble avoir un effet bénéfique sur l'évolution de la maladie.

- 5            Certaines données font également penser à un épissage alternatif, qui pourrait s'avérer un élément important dans la possibilité de générer des mutants qui pourraient jouer un rôle dans le développement de maladies inflammatoires.

              Le promoteur du gène IBD1 n'est actuellement pas identifié avec précision. Il est cependant raisonnable de penser, par analogie avec un très grand nombre de  
10 gènes que celui-ci réside, au moins pour partie, immédiatement en amont du gène, dans la portion 5' de celui-ci. Cette région génétique contient des séquences transcrites comme en témoigne la présence d'EST (HUMGS01037, AA835524, hs.105242, SHGC17274, hs.146128, hs.122983, hs.87280). Les clones ATCC contenant ces séquences ont été séquencés et analysés dans le laboratoire,  
15 permettant de mettre en évidence une organisation en exons et en introns avec d'éventuels épissages alternatifs. Ces données suggèrent l'existence d'un autre gène (nommé IBD1prox en raison de sa proximité d'IBD1). La séquence partielle de l'ADN complémentaire de IBD1prox est rapportée (SEQ ID N° 4) de même que sa structure intron-exon sur la SEQ ID N° 6.

- 20            La traduction des ADNc correspondant à IBD1prox aboutit à une protéine contenant une homéobox. L'analyse de plusieurs ADNc du gène suggère cependant l'existence d'épissages alternatifs. IBD1prox, selon un des épissages alternatifs possibles correspond à l'EST anonyme HUMGS01037 dont l'ARN est exprimé de manière plus importante dans les lignées leucocytaires différenciées que dans les  
25 lignées non différenciées.

              Ainsi, il est possible que ce gène puisse avoir un rôle dans l'inflammation et la différenciation cellulaire. Il peut donc lui aussi être considéré comme un bon candidat pour la susceptibilité aux MICI. L'association entre MC et le polymorphisme ctg35 ExC localisé sur la séquence codante de IBD1prox renforce  
30 cette hypothèse même si ce polymorphisme n'entraîne pas de variation de séquence au niveau protéique.

              La relation fonctionnelle entre IBD1 et IBD1prox n'est actuellement pas établie. Toutefois, la forte proximité entre les deux gènes pourrait refléter une

interaction entre ceux-ci. Dans ce cas, la localisation « tête -bêche » de ces gènes suggère qu'ils puissent avoir des modes de régulation communs ou interdépendants.

Exemple 6 : identifications de mutations du gène IBD1 dans les maladies inflammatoires

Afin de confirmer le rôle de IBD1 dans les maladies inflammatoires, la séquence codante et les jonctions intron-exon du gène ont été séquencées de l'exon 2 à l'exon 12 inclus chez 70 sujets indépendants, à savoir : 50 malades atteints de MC, 10 malades atteints de RCH, 1 malade atteint de syndrome de Blau et 9 témoins sains. Les malades étudiés étaient pour la plupart des formes familiales de la maladie et étaient souvent porteurs de l'haplotype de susceptibilité défini par les études de déséquilibre de transmission. Les témoins sains étaient d'origine caucasienne.

24 variants de séquence ont ainsi pu être identifiés sur ce groupe de 70 personnes non apparentées (tableau 3).

Tableau 3. Mutations observées dans le gène IBD1

Exon	Variant nucléotidique	Variant protéique	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique	Témoins sains
1	non testé				
2	G417A	silencieux			
2	C537G	silencieux			
3	aucun				
4	T805C	S269P	48/100	6/20	3/18
4	A869G	N290S	0	0	1/18
4	C905T	A302V	1/100	0	0
4	C1283T	P428L	1/100	0	0
4	C1284A	silencieux			
4	C1287T	silencieux			
4	T1380C	silencieux			
4	T1764G	silencieux			
4	G1837A	A613T	1/100	0	0
4	C2107T	R703W	10/10	1/20	1/18
4	C2110T	R704C	4/10	1/20	0
5	G2365A	R792Q	1/100	0	0
5	G2370A	V794M	0	1/20	0
5	G2530A	E844K	1/10	0	0

6	A2558G	N853S	1/100	0	0
6	A2590G	M864V	1/100	0	0
7	aucun				
8	G2725C	G909R	7/100	0	0
8	C2756A	A919D	1/100	0	0
9	G2866A	V956I	2/100	1/20	3/18
10	C2928T	silencieux			
11	3022insC	stop	20/100	0	0
12	aucun				

Les mutations autres que silencieuses observées dans chaque exon sont rapportées. Elles sont indiquées par la variation de la chaîne peptidique. Pour chaque mutation et pour chaque phénotype étudié, il est indiqué le nombre de fois où la mutation est observé, rapporté au nombre de chromosomes testés.

- 5       Aucun variant de séquence fonctionnel n'a été identifié dans les exons 1 à 3 (correspondants au domaine CARD de la protéine). Les exons 7 et 12 n'ont pas non plus montré de variation de séquence. Certains variants correspondaient à des polymorphismes déjà identifiés et typés pour les études de déséquilibre de transmission, à savoir :

- 10       -Snp3-2931 : variant nucléotidique T805C, variant protéique S269P  
           -ctg2931-5ag/ola : variant nucléotidique T1380C (silencieux)  
           -ctg2931-3ac/ola : variant nucléotidique T1764G (silencieux)  
           -SNP1 : variant nucléotidique C2107T, variant protéique R703W

- 15       Plusieurs variations de séquence étaient silencieuses (G417A, C537G, C1284A, C1287T, T1380C, T1764G, C2928T) et n'entraînaient pas de modification de la séquence protéique. Elles n'ont pas été étudiées davantage ici.

- 20       Pour les 16 variations de séquence non silencieuses, il a été observé des variants de séquence protéique chez 43/50 MC contre 5/9 témoins sains et 6/10 RCH. L'existence d'une ou plusieurs variation(s) de séquence apparaissait associée au phénotype MC. Il existait souvent plusieurs variations de séquence chez un même individu atteint de MC suggérant un effet parfois récessif du gène pour la MC. A l'inverse, aucun homozygote ou hétérozygote composite n'était observé parmi les patients atteints de RCH ou parmi les témoins sains.

- 25       Certains variants non silencieux étaient présents à la fois chez les malades atteints de RCH ou de MC et chez les sujets sains. Il s'agissait des variants S269P, N290S, R703W et V956I situés dans les exons 2, 4 et 9. Un complément

d'information semble donc nécessaire avant de retenir un éventuel rôle fonctionnel à ces variants de séquence.

V956I est une variation de séquence conservative (acides aminés aliphatiques).

- 5        Le variant de séquence S269P correspond à une variation de classe d'acide aminé (hydroxylé en immunoacide) au début du domaine liant les nucléotides. Il en déséquilibre de transmission avec la MC. Il s'agit en effet du polymorphisme Snp3 (Cf. supra).

- 10       R703W aboutit à une modification de la classe de l'acide aminé (aromatique au lieu de basique). Cette modification survient dans la région intermédiaire entre les domaines NBD et LRR, région conservée entre IBD1 et CARD4/NOD1. Un rôle fonctionnel peut donc être suspecté pour ce polymorphisme. Cette variation de séquence (correspondant au site polymorphe Snp1) est plus souvent transmise au malades atteints de MC que ne le veut le hasard (Cf. supra) confirmant que ce
- 15       polymorphisme est associé à la MC. Il est possible que la présence de ce mutant chez les sujets sains témoigne d'une pénétrance incomplète de la mutation comme cela est attendu pour les maladies génétiques complexes telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

- 20       Le variant R704C, situé immédiatement à côté de R703W a pu être identifié à la fois dans la MC et dans la RCH. Il correspond lui aussi à une variation non conservative de la protéine (acide aminé soufré au lieu de basique) sur la même région protéique, suggérant un effet fonctionnel aussi important pour R704C que pour R703W.

- 25       D'autres variations de séquence sont spécifiques de la MC de la RCH ou du syndrome de Blau.

- 30       Certaines variations de séquence sont au contraire rares, présentes chez un ou quelques malades (A613T, R704C, E844K, N853S, M864V, A919D). Il s'agit toujours de variations entraînant des modifications non conservatives de la protéine dans des domaines leucine riches, à des positions importantes au sein de ces domaines. Ces différents éléments suggèrent que ces variations ont un rôle fonctionnel.

Deux variations de séquence (G909R, L1008P\*) sont retrouvées chez un assez grand nombre de maladies de Crohn (respectivement 7/50 et 16/50) alors qu'elles ne sont pas détectées chez les témoins ou chez les malades atteints de RCH.

La délétion/insertion d'une guanosine au niveau du codon 1008 aboutit à une  
5 transformation de la troisième leucine de l'hélice alpha du dernier LRR en proline suivie d'un codon STOP (L1008P\*). Cette variation de séquence entraîne donc une modification importante de la protéine : réduction de taille de la protéine (protéine possédant un domaine LRR tronqué) et altération d'un acide aminé très conservé (Leucine). Cette modification de séquence est associée à la MC comme en témoigne  
10 une étude de déséquilibre de transmission dans 16 familles porteuses de la mutation (P=0,008).

La mutation G909R survient sur le dernier acide aminé du sixième motif LRR. Il remplace un acide aminé aliphatique en acide aminé basique. Cette variation est potentiellement importante compte tenu du caractère habituellement  
15 neutre ou polaire des acides aminés en position terminale des motifs leucine riche (tant pour IBD1 que pour NOD1/CARD4) et du caractère conservé de cet acide aminé sur les protéines IBD1 et NOD1/CARD4.

Dans le syndrome de Blau, les malades (n=2) de la famille étudiée étaient porteurs d'une variation de séquence spécifique (L470F), localisée dans l'exon 4 et  
20 correspondant au domaine NBD de la protéine. Dans cette série, ce variant de séquence était spécifique du syndrome de Blau.

Dans la RCH, plusieurs variants de séquence non retrouvés chez les sujets sains ont aussi été identifiés. La proportion de malades porteurs d'une mutation était plus modeste que pour la MC, comme attendu compte tenu de la liaison moins  
25 fortement établie entre IBD1 et RCH et du caractère supposé moins génétique de cette dernière maladie. Des variations de séquence étaient communes à la MC et à la RCH (R703W, R704C). D'autres au contraire apparaissaient spécifiques de la RCH (V794M). Cette observation permet de confirmer que MC et RCH sont des maladies partageant au moins en partie la même prédisposition génétique. Elle pose  
30 les bases d'une classification nosologique des MICI.

L'étude des variants de séquence du gène IBD1 a donc permis d'identifier plusieurs variants ayant un effet fonctionnel très probable (ex : protéine tronquée) et associés à la maladie de Crohn, à la RCH et au syndrome de Blau.



Le promoteur du gène n'est actuellement pas déterminé. Selon toute vraisemblance cependant, celui-ci est probablement situé dans la région 5' en amont du gène. Selon cette hypothèse, les variants de séquence observés dans cette région peuvent avoir un effet fonctionnel. Ceci pourrait expliquer la très forte association  
5 entre MC et certains locus polymorphes tels que ctg35 ExC ou Ctg25Ex1.

L'invention fournit ainsi la première description de mutations dans la famille des gènes contenant un domaine CARD chez l'homme. La fréquence de ces mutations dans des maladies inflammatoires variées montre que le gène IBD1 a un rôle essentiel dans le processus inflammatoire normal et pathologique. Cette  
10 invention fournit de nouvelles voies de compréhension et de recherche dans le domaine de la physiopathologie des processus inflammatoires normaux et pathologiques. Elle permet de ce fait d'envisager le développement de nouvelles molécules pharmaceutiques régulant les voies effectrices contrôlées par IBD1 et utiles dans le traitement des maladies inflammatoires et la régulation du processus  
15 inflammatoire en général.

Le gène IBD1prox, situé dans la région promotrice de IBD1, et dont la séquence partielle est dévoilée dans la présente invention, peut lui aussi avoir un rôle important dans la régulation de l'apoptose cellulaire et du processus inflammatoire, comme suggéré par son expression différentielle dans les cellules  
20 matures du système immunitaire. La forte association rapportée dans ce travail entre le marqueur de polymorphisme ctg35ExC (situé dans la région transcrite du gène) et la maladie de Crohn, plaide aussi très fortement en faveur de cette hypothèse.

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont des maladies génétiques complexes pour lesquelles, à ce jour, aucun gène de susceptibilité n'avait été  
25 identifié avec certitude. L'invention a permis de l'identification du premier gène de susceptibilité à la maladie de Crohn, par une démarche de clonage positionnel (ou génétique reverse). Il s'agit là de la première localisation génétique obtenue par une telle approche pour une maladie génétique complexe, ce qui démontre son utilité et sa faisabilité, au moins dans certains cas dans les maladies génétiques complexes.

30 La présente invention concerne aussi un acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés d'une protéine choisie parmi SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 5.

### Références

- Asakawa et al.(1997), Gene, 191, 69
- Becker et al. (1998), Proc Natl Acad Sci USA, 95, 9979
- Bertin et al. (1999), J Biol Chem, 274, 12955
- 5 Buckholz, (1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 538.
- Carter, (1993) Curr. Op. Biotechnology 3, 533.
- Cho et al. (1998), Proc Natl Acad Sci USA, 95, 7502.
- Duck et al. (1990), Biotechniques, 9, 142.
- Edwards et Aruffo (1993), Curr. Op. Biotechnology, 4, 558.
- 10 Epstein (1992) Médecine/Sciences, 8, 902.
- Guatelli et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874.
- Hugot et al. (1996), Nature, 379, 821.
- Inohara et al. (1999) J Biol Chem, 274, 14560.
- Kievitis et al. (1991), J. Virol. Methods, 35, 273.
- 15 Kim et al., (1996) Genomics, 34, 213.
- Köhler et Milstein. (1975) Nature 256, 495.
- Kwoh, et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173.
- Landegren et al. (1988) Science 241, 1077.
- Lander et Kruglyak (1995) Nat Genet, 11, 241.
- 20 Luckow (1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 564.
- Matthews et al. (1988), Anal. Biochem., 169, 1-25.
- Miele et al. (1983), J. Mol. Biol., 171, 281.
- Neddleman et Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443
- Olins et Lee (1993), Curr. Op. Biotechnology 4 : 520.
- 25 Perricaudet et al. (1992). La Recherche 23 : 471.
- Pearson et Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444
- Rioux et al. (1998) Gastroenterology, 115: 1062.
- Rohlmann et al. (1996) Nature Biotech. 14 : 1562.
- Rolfs, A. et al. (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- 30 Rouquier et al. (1994), Anal Biochem 217, 205.
- Sambrook et al. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Satsangi et al. (1996), Nat Genet, 14 : 199.

- Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.
- Smith et Waterman (1981) Ad. App. Math. 2 : 482
- Stewart et Yound (1984), Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ème éd., (1984).
- 5 Spielman et al. (1993) Am J Hum Genet, 52, 506.
- Temin, (1986) Retrovirus vectors for gene transfer. In Kucherlapati R., ed. Gene Transfer, New York, Plenum Press, 149-187.
- Tromp et al. (1996) Am J Hum Genet, 59 : 1097.
- Walker (1992), Nucleic Acids Res. 20 : 1691.

### Revendications

1. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :
  - 5 a) SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 6 ;
  - b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 ou SEQ ID N° 6 ;
  - 10 c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;
  - d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) ;
  - 15 e) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).
2. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 4, la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à  
20 une de ces séquences.
3. Acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés d'une protéine choisie parmi SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 5.  
25
4. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :
  - a) un polypeptide correspondant à SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5 ;
  - 30 b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
  - c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'homologie avec ledit polypeptide de a) ;

- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

5

5. Polypeptide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5 ou une séquence possédant au moins 80 % d'homologie avec l'une de ces séquences après alignement optimal.

10

6. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ou codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 4 et 5.

15

7. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon la revendication 6.

8. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon la revendication 7.

20

9. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 en tant que sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

25

10. Utilisation *in vitro* d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 comme oligonucléotide sens ou antisens.

11. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 pour la production d'un polypeptide recombinant.

30

12. Procédé d'obtention d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon la revendication 7 dans des conditions permettant l'expression dudit polypeptide et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

13. Polypeptide recombinant caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 12.

5           14. Anticorps monoclonal ou polyclonal caractérisé en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13.

15. Procédé de détection d'un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10           a) mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 14 ;  
b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

15           16. Trousse de réactifs pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon la revendication 14 ;  
b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;  
20           c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

25           17. Méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique d'une maladie inflammatoire et/ou immune ou d'un cancer caractérisée en ce qu'on détermine à partir d'un prélèvement biologique d'un patient la présence d'au moins une mutation et/ou une altération d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 ou SEQ ID N° 6 par l'analyse de tout ou partie d'une séquence nucléique correspondant audit gène.

30           18. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.

19. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13, ou un anticorps selon la revendication 14.

20. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, marqué ;
- b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

21. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon biologique à l'aide d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 2.

22. Procédé de criblage de composés capables de se fixer à un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13, d'une cellule selon la revendication 7, ou d'un mammifère selon la revendication 8, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit polypeptide.

23. Procédé de criblage de composés capables d'interagir *in vitro* ou *in vivo* avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de mise en contact d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, d'une cellule selon la revendication 7, ou d'un mammifère selon la revendication 8, avec un composé candidat et de détection de la formation d'un complexe entre ledit composé candidat et ledit acide nucléique

24. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi

- a) un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ;

- b) un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 13 ;
- c) un vecteur selon la revendication 6 ;
- d) une cellule selon la revendication 7 ; et
- e) un anticorps selon la revendication 14 ;

5           à titre de médicament.

25. Composé selon la revendication 24, pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie inflammatoire et/ou immune ou d'un cancer associé à la présence d'au moins une mutation du gène correspondant à SEQ ID N° 1 ou SEQ  
10 ID N° 4.



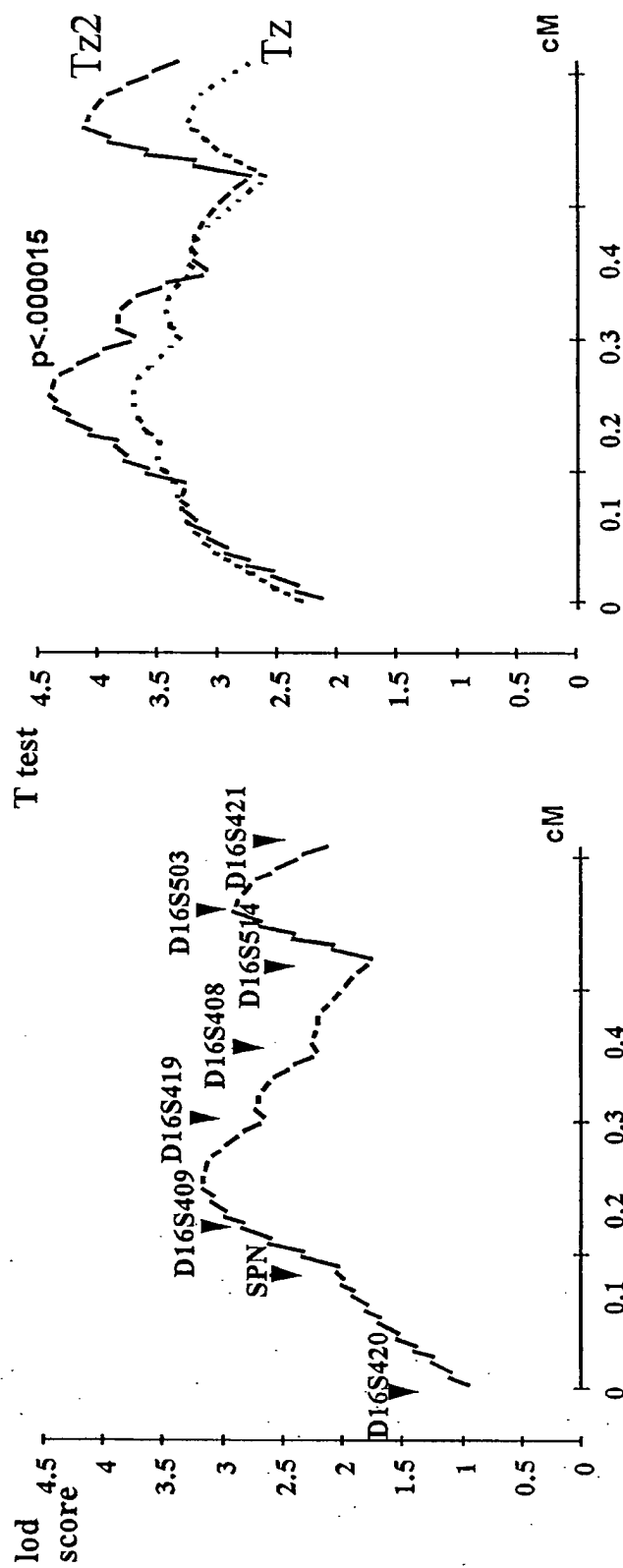


FIG.1

2/3

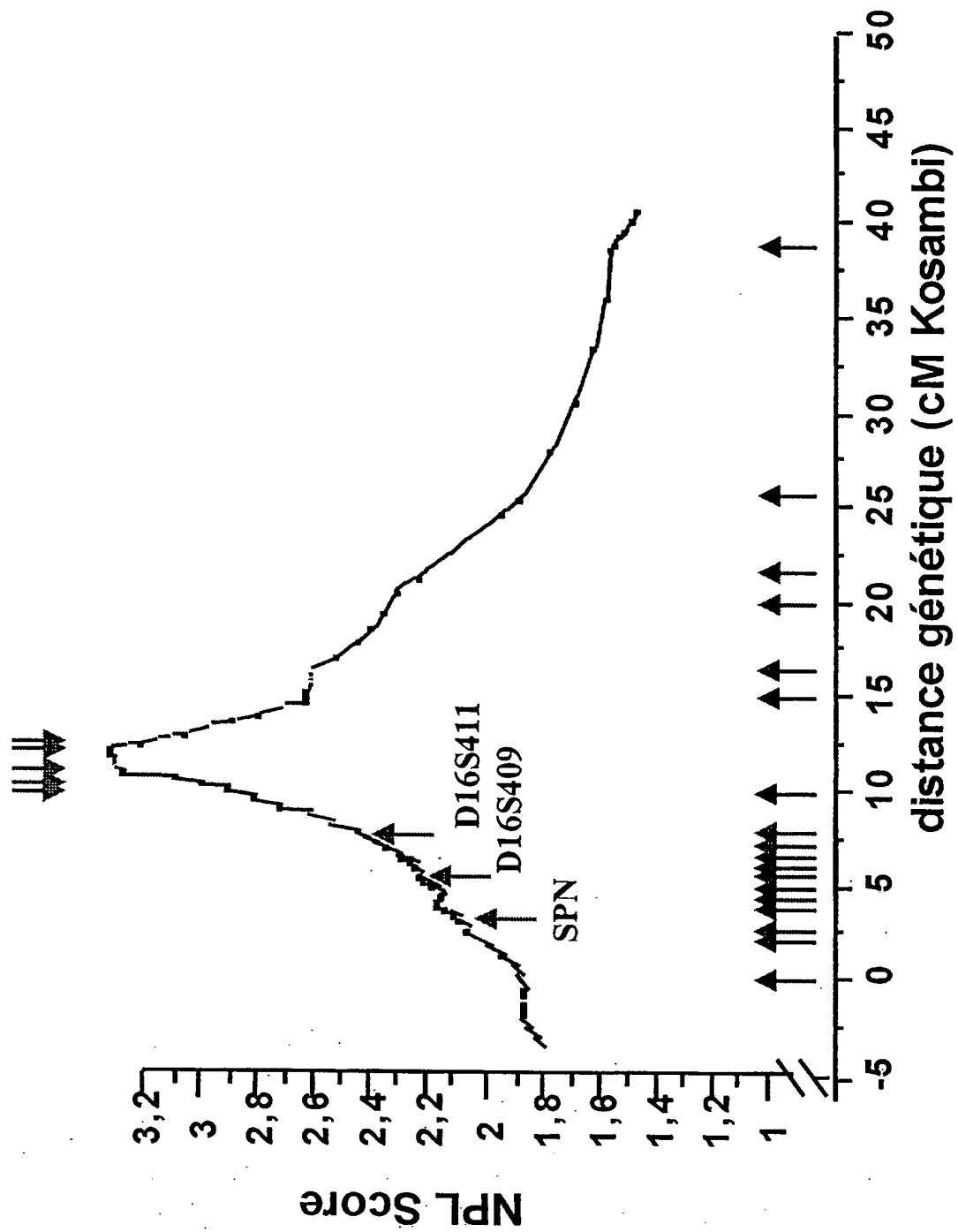
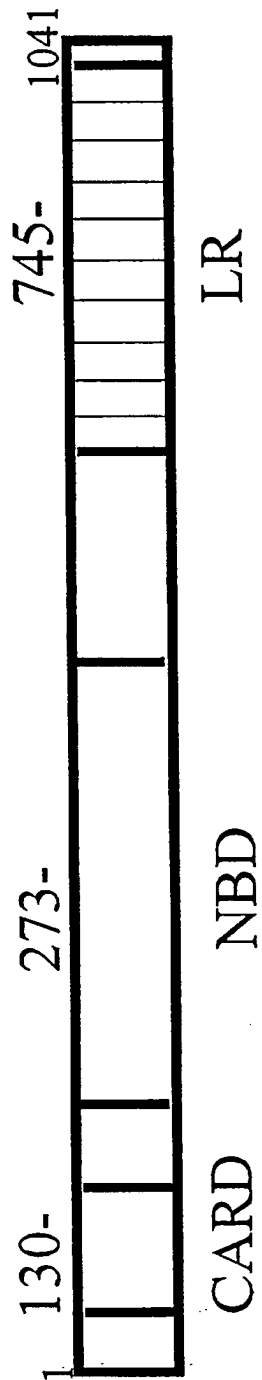


FIG.2

FIG. 3

## LISTE DE SÉQUENCES

&lt;110&gt; Fondation Jean Dausset - CEPH

&lt;120&gt; Gènes impliqués dans les maladies inflammatoires de l'intestin et leur utilisation

&lt;130&gt; D18702

&lt;160&gt; 90

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4322

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(3123)

&lt;400&gt; 1

atg gag aag aga agg ggt cta acc att gag tgc tgg ggc ccc caa agt	48
Met Glu Lys Arg Arg Gly Leu Thr Ile Glu Cys Trp Gly Pro Gln Ser	
1 5 10 15	
ccc tca ctg acc ttg ttc tcc tcc cca ggt tgt gaa atg tgc tcg cag	96
Pro Ser Leu Thr Leu Phe Ser Ser Pro Gly Cys Glu Met Cys Ser Gln	
20 25 30	
gag gct ttt cag gca cag agg agc cag ctg gtc gag ctg ctg gtc tca	144
Glu Ala Phe Gln Ala Gln Arg Ser Gln Leu Val Glu Leu Leu Val Ser	
35 40 45	
ggg tcc ctg gaa ggc ttc gag agt gtc ctg gac tgg ctg ctg tcc tgg	192
Gly Ser Leu Glu Gly Phe Glu Ser Val Leu Asp Trp Leu Leu Ser Trp	
50 55 60	
gag gtc ctc tcc tgg gag gac tac gag ggc ttc cac ctc ctg ggc cag	240
Glu Val Leu Ser Trp Glu Asp Tyr Glu Gly Phe His Leu Leu Gly Gln	
65 70 75 80	
cct ctc tcc cac ttg gcc agg cgc ctt ctg gac acc gtc tgg aat aag	288
Pro Leu Ser His Leu Ala Arg Arg Leu Leu Asp Thr Val Trp Asn Lys	
85 90 95	
ggt act tgg gcc tgt cag aag ctc atc gcg gct gcc caa gaa gcc cag	336
Gly Thr Trp Ala Cys Gln Lys Leu Ile Ala Ala Ala Gln Glu Ala Gln	
100 105 110	
gcc gac agc cag tcc ccc aag ctg cat ggc tgc tgg gac ccc cac tcg	384
Ala Asp Ser Gln Ser Pro Lys Leu His Gly Cys Trp Asp Pro His Ser	
115 120 125	
ctc cac cca gcc cga gac ctg cag agt cac cgg cca gcc att gtc agg	432
Leu His Pro Ala Arg Asp Leu Gln Ser His Arg Pro Ala Ile Val Arg	
130 135 140	
agg ctc cac agc cat gtg gag aac atg ctg gac ctg gca tgg gag cgg	480
Arg Leu His Ser His Val Glu Asn Met Leu Asp Leu Ala Trp Glu Arg	

145	150	155	160	
ggt ttc gtc agc cag tat gaa tgt gat gaa atc agg ttg ccg atc ttc				528
Gly Phe Val Ser Gln Tyr Glu Cys Asp Glu Ile Arg Leu Pro Ile Phe	165	170	175	
aca ccg tcc cag agg gca aga agg ctg ctt gat ctt gcc acg gtg aaa				576
Thr Pro Ser Gln Arg Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ala Thr Val Lys	180	185	190	
gcg aat gga ttg gct gcc ttc ctt cta caa cat gtt cag gaa tta cca				624
Ala Asn Gly Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gln His Val Gln Glu Leu Pro	195	200	205	
gtc cca ttg gcc ctg cct ttg gaa gct gcc aca tgc aag aag tat atg				672
Val Pro Leu Ala Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr Cys Lys Lys Tyr Met	210	215	220	
gcc aag ctg agg acc acg gtg tct gct cag tct cgc ttc ctc agt acc				720
Ala Lys Leu Arg Thr Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Phe Leu Ser Thr	225	230	235	240
tat gat gga gca gag acg ctc tgc ctg gag gac ata tac aca gag aat				768
Tyr Asp Gly Ala Glu Thr Leu Cys Leu Glu Asp Ile Tyr Thr Glu Asn	245	250	255	
gtc ctg gag gtc tgg gca gat gtg ggc atg gct gga tcc ccg cag aag				816
Val Leu Glu Val Trp Ala Asp Val Gly Met Ala Gly Ser Pro Gln Lys	260	265	270	
agc cca gcc acc ctg ggc ctg gag gag ctc ttc agc acc cct ggc cac				864
Ser Pro Ala Thr Leu Gly Leu Glu Glu Leu Phe Ser Thr Pro Gly His	275	280	285	
ctc aat gac gat gcg gac act gtg ctg gtg gtg ggt gag gcg ggc agt				912
Leu Asn Asp Asp Ala Asp Thr Val Leu Val Val Gly Glu Ala Gly Ser	290	295	300	
ggc aag agc acg ctc ctg cag cgg ctg cac ttg ctg tgg gct gca ggg				960
Gly Lys Ser Thr Leu Leu Gln Arg Leu His Leu Leu Trp Ala Ala Gly	305	310	315	320
caa gac ttc cag gaa ttt ctc ttt gtc ttc cca ttc agc tgc cgg cag				1008
Gln Asp Phe Gln Glu Phe Leu Phe Val Phe Pro Phe Ser Cys Arg Gln	325	330	335	
ctg cag tgc atg gcc aaa cca ctc tct gtg cgg act cta ctc ttt gag				1056
Leu Gln Cys Met Ala Lys Pro Leu Ser Val Arg Thr Leu Leu Phe Glu	340	345	350	
cac tgc tgt tgg cct gat gtt ggt caa gaa gac atc ttc cag tta ctc				1104
His Cys Cys Trp Pro Asp Val Gly Gln Glu Asp Ile Phe Gln Leu Leu	355	360	365	
ctt gac cac cct gac cgt gtc ctg tta acc ttt gat ggc ttt gac gag				1152
Leu Asp His Pro Asp Arg Val Leu Leu Thr Phe Asp Gly Phe Asp Glu	370	375	380	
ttc aag ttc agg ttc acg gat cgt gaa cgc cac tgc tcc ccg acc gac				1200
Phe Lys Phe Arg Phe Thr Asp Arg Glu Arg His Cys Ser Pro Thr Asp	385	390	395	400

ccc acc tct gtc cag acc ctg ctc ttc aac ctt ctg cag ggc aac ctg	1248
Pro Thr Ser Val Gln Thr Leu Leu Phe Asn Leu Leu Gln Gly Asn Leu	
405 410 415	
ctg aag aat gcc cgc aag gtg gtg acc agc cgt ccg gcc gct gtg tcg	1296
Leu Lys Asn Ala Arg Lys Val Val Thr Ser Arg Pro Ala Ala Val Ser	
420 425 430	
gcg ttc ctc agg aag tac atc cgc acc gag ttc aac ctc aag ggc ttc	1344
Ala Phe Leu Arg Lys Tyr Ile Arg Thr Glu Phe Asn Leu Lys Gly Phe	
435 440 445	
tct gaa cag ggc atc gag ctg tac ctg agg aag cgt cat cat gag ccc	1392
Ser Glu Gln Gly Ile Glu Leu Tyr Leu Arg Lys Arg His His Glu Pro	
450 455 460	
ggg gtg gcg gac cgc ctc atc cgc ctg ctc caa gag acc tca gcc ctg	1440
Gly Val Ala Asp Arg Leu Ile Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Ala Leu	
465 470 475 480	
cac ggt ttg tgc cac ctg cct gtc ttc tca tgg atg gtg tcc aaa tgc	1488
His Gly Leu Cys His Leu Pro Val Phe Ser Trp Met Val Ser Lys Cys	
485 490 495	
cac cag gaa ctg ttg ctg cag gag ggg ggg tcc cca aag acc act aca	1536
His Gln Glu Leu Leu Leu Gln Glu Gly Gly Ser Pro Lys Thr Thr Thr	
500 505 510	
gat atg tac ctg ctg att ctg cag cat ttt ctg ctg cat gcc acc ccc	1584
Asp Met Tyr Leu Leu Ile Leu Gln His Phe Leu Leu His Ala Thr Pro	
515 520 525	
cca gac tca gct tcc caa ggt ctg gga ccc agt ctt ctt cgg ggc cgc	1632
Pro Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Gly Pro Ser Leu Leu Arg Gly Arg	
530 535 540	
ctc ccc acc ctc ctg cac ctg ggc aga ctg gct ctg tgg ggc ctg ggc	1680
Leu Pro Thr Leu Leu His Leu Gly Arg Leu Ala Leu Trp Gly Leu Gly	
545 550 555 560	
atg tgc tgc tac gtg ttc tca gcc cag cag ctc cag gca gca cag gtc	1728
Met Cys Cys Tyr Val Phe Ser Ala Gln Gln Leu Gln Ala Ala Gln Val	
565 570 575	
agc cct gat gac att tct ctt ggc ttc ctg gtg cgt gcc aaa ggt gtc	1776
Ser Pro Asp Asp Ile Ser Leu Gly Phe Leu Val Arg Ala Lys Gly Val	
580 585 590	
gtg cca ggg agt acg gcg ccc ctg gaa ttc ctt cac atc act ttc cag	1824
Val Pro Gly Ser Thr Ala Pro Leu Glu Phe Leu His Ile Thr Phe Gln	
595 600 605	
tgc ttc ttt gcc gcg ttc tac ctg gca ctc agt gct gat gtg cca cca	1872
Cys Phe Phe Ala Ala Phe Tyr Leu Ala Leu Ser Ala Asp Val Pro Pro	
610 615 620	
gct ttg ctc aga cac ctc ttc aat tgt ggc agg cca ggc aac tca cca	1920
Ala Leu Leu Arg His Leu Phe Asn Cys Gly Arg Pro Gly Asn Ser Pro	
625 630 635 640	

atg gcc agg ctc ctg ccc acg atg tgc atc cag gcc tcg gag gga aag	1968
Met Ala Arg Leu Leu Pro Thr Met Cys Ile Gln Ala Ser Glu Gly Lys	
645 650 655	
gac agc agc gtg gca gct ttg ctg cag aag gcc gag ccg cac aac ctt	2016
Asp Ser Ser Val Ala Ala Leu Leu Gln Lys Ala Glu Pro His Asn Leu	
660 665 670	
cag atc aca gca gcc ttc ctg gca ggg ctg ttg tcc cgg gag cac tgg	2064
Gln Ile Thr Ala Ala Phe Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Glu His Trp	
675 680 685	
ggc ctg ctg gct gag tgc cag aca tct gag aag gcc ctg ctc cgg cgc	2112
Gly Leu Leu Ala Glu Cys Gln Thr Ser Glu Lys Ala Leu Leu Arg Arg	
690 695 700	
cag gcc tgt gcc cgc tgg tgt ctg gcc cgc agc ctc cgc aag cac ttc	2160
Gln Ala Cys Ala Arg Trp Cys Leu Ala Arg Ser Leu Arg Lys His Phe	
705 710 715 720	
cac tcc atc ccg cca gct gca ccg ggt gag gcc aag agc gtg cat gcc	2208
His Ser Ile Pro Pro Ala Ala Pro Gly Glu Ala Lys Ser Val His Ala	
725 730 735	
atg ccc ggg ttc atc tgg ctc atc cgg agc ctg tac gag atg cag gag	2256
Met Pro Gly Phe Ile Trp Leu Ile Arg Ser Leu Tyr Glu Met Gln Glu	
740 745 750	
gag cgg ctg gct cgg aag gct gca cgt ggc ctg aat gtt ggg cac ctc	2304
Glu Arg Leu Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly His Leu	
755 760 765	
aag ttg aca ttt tgc agt gtg ggc ccc act gag tgt gct gcc ctg gcc	2352
Lys Leu Thr Phe Cys Ser Val Gly Pro Thr Glu Cys Ala Ala Leu Ala	
770 775 780	
ttt gtg ctg cag cac ctt cgg cgg ccc gtg gcc ctg cag ctg gac tac	2400
Phe Val Leu Gln His Leu Arg Arg Pro Val Ala Leu Gln Leu Asp Tyr	
785 790 795 800	
aac tct gtg ggt gac att ggc gtg gag cag ctg ctg cct tgc ctt ggt	2448
Asn Ser Val Gly Asp Ile Gly Val Glu Gln Leu Leu Pro Cys Leu Gly	
805 810 815	
gtc tgc aag gct ctg tat ttg cgc gat aac aat atc tca gac cga ggc	2496
Val Cys Lys Ala Leu Tyr Leu Arg Asp Asn Asn Ile Ser Asp Arg Gly	
820 825 830	
atc tgc aag ctc att gaa tgt gct ctt cac tgc gag caa ttg cag aag	2544
Ile Cys Lys Leu Ile Glu Cys Ala Leu His Cys Glu Gln Leu Gln Lys	
835 840 845	
tta gct cta ttc aac aac aaa ttg act gac ggc tgt gca cac tcc atg	2592
Leu Ala Leu Phe Asn Asn Lys Leu Thr Asp Gly Cys Ala His Ser Met	
850 855 860	
gct aag ctc ctt gca tgc agg cag aac ttc ttg gca ttg agg ctg ggg	2640
Ala Lys Leu Leu Ala Cys Arg Gln Asn Phe Leu Ala Leu Arg Leu Gly	
865 870 875 880	
aat aac tac atc act gcc gcg gga gcc caa gtg ctg gcc gag ggg ctc	2688

Asn Asn Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Ala Gln Val Leu Ala Glu Gly Leu  
 885 890 895  
 cga ggc aac acc tcc ttg cag ttc ctg gga ttc tgg ggc aac aga gtg 2736  
 Arg Gly Asn Thr Ser Leu Gln Phe Leu Gly Phe Trp Gly Asn Arg Val  
 900 905 910  
 ggt gac gag ggg gcc cag gcc ctg gct gaa gcc ttg ggt gat cac cag 2784  
 Gly Asp Glu Gly Ala Gln Ala Leu Ala Glu Ala Leu Gly Asp His Gln  
 915 920 925  
 agc ttg agg tgg ctc agc ctg gtg ggg aac aac att ggc agt gtg ggt 2832  
 Ser Leu Arg Trp Leu Ser Leu Val Gly Asn Asn Ile Gly Ser Val Gly  
 930 935 940  
 gcc caa gcc ttg gca ctg atg ctg gca aag aac gtc atg cta gaa gaa 2880  
 Ala Gln Ala Leu Ala Leu Met Leu Ala Lys Asn Val Met Leu Glu Glu  
 945 950 955 960  
 ctc tgc ctg gag gag aac cat ctc cag gat gaa ggt gta tgt tct ctc 2928  
 Leu Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Gln Asp Glu Gly Val Cys Ser Leu  
 965 970 975  
 gca gaa gga ctg aag aaa aat tca agt ttg aaa atc ctg aag ttg tcc 2976  
 Ala Glu Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Leu Lys Ile Leu Lys Leu Ser  
 980 985 990  
 aat aac tgc atc acc tac cta ggg gca gaa gcc ctc ctg cag gcc ctt 3024  
 Asn Asn Cys Ile Thr Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Leu Gln Ala Leu  
 995 1000 1005  
 gaa agg aat gac acc atc ctg gaa gtc tgg ctc cga ggg aac act ttc 3072  
 Glu Arg Asn Asp Thr Ile Leu Glu Val Trp Leu Arg Gly Asn Thr Phe  
 1010 1015 1020  
 tct cta gag gag gtt gac aag ctc ggc tgc agg gac acc aga ctc ttg 3120  
 Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu Leu  
 1025 1030 1035 1040  
 ctt tgaagtctcc gggaggatgt tcgtctcagt ttgtttgtga caggctgtga 3173  
 Leu  
 gtttgggccc cagaggctgg gtgacatgtg ttggcagcct cttcaaatg agccctgtcc 3233  
 tgcctaaggc tgaacttggt ttctgggaac accataggtc acctttattc tggcagagga 3293  
 gggagcatca gtgccctcca ggatagactt tcccaagcc tacttttgcc attgacttct 3353  
 tcccaagatt caatcccagg atgtacaagg acagcccccc tccatagtat gggactggcc 3413  
 tctgctgac ccccaggct tccgtgtggg tcagtggggc ccatggatgt gcttgtaac 3473  
 tgagtgcctt ttggtggaga ggcccggccc acataattca ggaagcagct tccccatgt 3533  
 ctgactcat ccatccaggc cattccccgt ctctggttcc tccccctc ctggactcct 3593  
 gcacacgctc cttcctctga ggctgaaatt cagaatatta gtgacctcag ctttgatatt 3653  
 tcacttacag ccccccaac cctggcacc agggtgggaa gggctacacc ttagcctgcc 3713  
 ctcccttccg gtgtttaaga cttttttgga aggggacacg tgacagccgt ttgttcccca 3773



agacattcta ggtttgcaag aaaaatatga ccacactcca gctgggatca catgtggact 3833  
 tttatttcca gtgaaatcag ttactcttca gttaagcctt tggaacagc tgcacttta 3893  
 aaagctccaa atgcagcttt aaaaaattaa tctgggccag aatttcaaac ggcctcacta 3953  
 ggcttctggt tgatgcctgt gaactgaact ctgacaacag acttctgaaa tagaccaca 4013  
 agaggcagtt ccatttcatt tgtgccagaa tgctttagga tgtacagtta tggattgaaa 4073  
 gtttacagga aaaaaatta ggccgttcct tcaaagcaaa tgtcttcctg gattattcaa 4133  
 aatgatgtat gttgaagcct ttgtaattg tcagatgctg tgcaaagtgt attattttaa 4193  
 acattatgat gtgtgaaaac tggttaatat ttataggtca ctttggttta ctgtcttaag 4253  
 tttatactct tatagacaac atggccgtga actttatgct gtaaataatc agaggggaat 4313  
 aaactgttg 4322

<210> 2  
 <211> 1041  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Glu Lys Arg Arg Gly Leu Thr Ile Glu Cys Trp Gly Pro Gln Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Ser Leu Thr Leu Phe Ser Ser Pro Gly Cys Glu Met Cys Ser Gln  
 20 25 30  
 Glu Ala Phe Gln Ala Gln Arg Ser Gln Leu Val Glu Leu Leu Val Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Leu Glu Gly Phe Glu Ser Val Leu Asp Trp Leu Leu Ser Trp  
 50 55 60  
 Glu Val Leu Ser Trp Glu Asp Tyr Glu Gly Phe His Leu Leu Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Pro Leu Ser His Leu Ala Arg Arg Leu Leu Asp Thr Val Trp Asn Lys  
 85 90 95  
 Gly Thr Trp Ala Cys Gln Lys Leu Ile Ala Ala Ala Gln Glu Ala Gln  
 100 105 110  
 Ala Asp Ser Gln Ser Pro Lys Leu His Gly Cys Trp Asp Pro His Ser  
 115 120 125  
 Leu His Pro Ala Arg Asp Leu Gln Ser His Arg Pro Ala Ile Val Arg  
 130 135 140  
 Arg Leu His Ser His Val Glu Asn Met Leu Asp Leu Ala Trp Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Phe Val Ser Gln Tyr Glu Cys Asp Glu Ile Arg Leu Pro Ile Phe  
 165 170 175

Thr Pro Ser Gln Arg Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ala Thr Val Lys  
 180 185 190  
 Ala Asn Gly Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gln His Val Gln Glu Leu Pro  
 195 200 205  
 Val Pro Leu Ala Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr Cys Lys Lys Tyr Met  
 210 215 220  
 Ala Lys Leu Arg Thr Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Phe Leu Ser Thr  
 225 230 235 240  
 Tyr Asp Gly Ala Glu Thr Leu Cys Leu Glu Asp Ile Tyr Thr Glu Asn  
 245 250 255  
 Val Leu Glu Val Trp Ala Asp Val Gly Met Ala Gly Ser Pro Gln Lys  
 260 265 270  
 Ser Pro Ala Thr Leu Gly Leu Glu Glu Leu Phe Ser Thr Pro Gly His  
 275 280 285  
 Leu Asn Asp Asp Ala Asp Thr Val Leu Val Val Gly Glu Ala Gly Ser  
 290 295 300  
 Gly Lys Ser Thr Leu Leu Gln Arg Leu His Leu Leu Trp Ala Ala Gly  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Phe Gln Glu Phe Leu Phe Val Phe Pro Phe Ser Cys Arg Gln  
 325 330 335  
 Leu Gln Cys Met Ala Lys Pro Leu Ser Val Arg Thr Leu Leu Phe Glu  
 340 345 350  
 His Cys Cys Trp Pro Asp Val Gly Gln Glu Asp Ile Phe Gln Leu Leu  
 355 360 365  
 Leu Asp His Pro Asp Arg Val Leu Leu Thr Phe Asp Gly Phe Asp Glu  
 370 375 380  
 Phe Lys Phe Arg Phe Thr Asp Arg Glu Arg His Cys Ser Pro Thr Asp  
 385 390 395 400  
 Pro Thr Ser Val Gln Thr Leu Leu Phe Asn Leu Leu Gln Gly Asn Leu  
 405 410 415  
 Leu Lys Asn Ala Arg Lys Val Val Thr Ser Arg Pro Ala Ala Val Ser  
 420 425 430  
 Ala Phe Leu Arg Lys Tyr Ile Arg Thr Glu Phe Asn Leu Lys Gly Phe  
 435 440 445  
 Ser Glu Gln Gly Ile Glu Leu Tyr Leu Arg Lys Arg His His Glu Pro  
 450 455 460  
 Gly Val Ala Asp Arg Leu Ile Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Ala Leu  
 465 470 475 480  
 His Gly Leu Cys His Leu Pro Val Phe Ser Trp Met Val Ser Lys Cys  
 485 490 495  
 His Gln Glu Leu Leu Leu Gln Glu Gly Gly Ser Pro Lys Thr Thr Thr

500					505					510						
Asp	Met	Tyr	Leu	Leu	Ile	Leu	Gln	His	Phe	Leu	Leu	His	Ala	Thr	Pro	
515					520					525						
Pro	Asp	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg	Gly	Arg	
530					535					540						
Leu	Pro	Thr	Leu	Leu	His	Leu	Gly	Arg	Leu	Ala	Leu	Trp	Gly	Leu	Gly	
545					550					555					560	
Met	Cys	Cys	Tyr	Val	Phe	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Gln	Val	
565					570					575						
Ser	Pro	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Val	Arg	Ala	Lys	Gly	Val	
580					585					590						
Val	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Leu	Glu	Phe	Leu	His	Ile	Thr	Phe	Gln	
595					600					605						
Cys	Phe	Phe	Ala	Ala	Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Asp	Val	Pro	Pro	
610					615					620						
Ala	Leu	Leu	Arg	His	Leu	Phe	Asn	Cys	Gly	Arg	Pro	Gly	Asn	Ser	Pro	
625					630					635					640	
Met	Ala	Arg	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Cys	Ile	Gln	Ala	Ser	Glu	Gly	Lys	
645					650					655						
Asp	Ser	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Gln	Lys	Ala	Glu	Pro	His	Asn	Leu	
660					665					670						
Gln	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Glu	His	Trp	
675					680					685						
Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Cys	Gln	Thr	Ser	Glu	Lys	Ala	Leu	Leu	Arg	Arg	
690					695					700						
Gln	Ala	Cys	Ala	Arg	Trp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ser	Leu	Arg	Lys	His	Phe	
705					710					715					720	
His	Ser	Ile	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Lys	Ser	Val	His	Ala	
725					730					735						
Met	Pro	Gly	Phe	Ile	Trp	Leu	Ile	Arg	Ser	Leu	Tyr	Glu	Met	Gln	Glu	
740					745					750						
Glu	Arg	Leu	Ala	Arg	Lys	Ala	Ala	Arg	Gly	Leu	Asn	Val	Gly	His	Leu	
755					760					765						
Lys	Leu	Thr	Phe	Cys	Ser	Val	Gly	Pro	Thr	Glu	Cys	Ala	Ala	Leu	Ala	
770					775					780						
Phe	Val	Leu	Gln	His	Leu	Arg	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Leu	Asp	Tyr	
785					790					795					800	
Asn	Ser	Val	Gly	Asp	Ile	Gly	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Pro	Cys	Leu	Gly	
805					810					815						
Val	Cys	Lys	Ala	Leu	Tyr	Leu	Arg	Asp	Asn	Asn	Ile	Ser	Asp	Arg	Gly	
820					825					830						

Ile Cys Lys Leu Ile Glu Cys Ala Leu His Cys Glu Gln Leu Gln Lys  
           835                          840                          845  
 Leu Ala Leu Phe Asn Asn Lys Leu Thr Asp Gly Cys Ala His Ser Met  
           850                          855                          860  
 Ala Lys Leu Leu Ala Cys Arg Gln Asn Phe Leu Ala Leu Arg Leu Gly  
           865                          870                          875                          880  
 Asn Asn Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Ala Gln Val Leu Ala Glu Gly Leu  
                           885                          890                          895  
 Arg Gly Asn Thr Ser Leu Gln Phe Leu Gly Phe Trp Gly Asn Arg Val  
                           900                          905                          910  
 Gly Asp Glu Gly Ala Gln Ala Leu Ala Glu Ala Leu Gly Asp His Gln  
           915                          920                          925  
 Ser Leu Arg Trp Leu Ser Leu Val Gly Asn Asn Ile Gly Ser Val Gly  
           930                          935                          940  
 Ala Gln Ala Leu Ala Leu Met Leu Ala Lys Asn Val Met Leu Glu Glu  
           945                          950                          955                          960  
 Leu Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Gln Asp Glu Gly Val Cys Ser Leu  
                           965                          970                          975  
 Ala Glu Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Leu Lys Ile Leu Lys Leu Ser  
           980                          985                          990  
 Asn Asn Cys Ile Thr Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Leu Gln Ala Leu  
           995                          1000                          1005  
 Glu Arg Asn Asp Thr Ile Leu Glu Val Trp Leu Arg Gly Asn Thr Phe  
           1010                          1015                          1020  
 Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu Leu  
           1025                          1030                          1035                          1040  
 Leu

<210> 3  
 <211> 37443  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> exon  
 <222> (63)..(106)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (3908)..(4406)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (12307)..(12412)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (15010)..(16825)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (21017)..(21100)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (21321)..(21404)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (24355)..(24438)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (27052)..(27135)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (27730)..(27813)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (29917)..(30000)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (34244)..(34327)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (36123)..(37443)

<400> 3  
 tcaccatata actggtattt aaagccacaa gagcaggttg gctcatctag ggatggagtg 60  
 atatggagaa gagaaggggt ctaaccattg agtgctgggg cccccagtg taggaaccag 120  
 ccaagaagac agaaagagtg aaaatcagag agttgggggtg tcctggagga aatgaagaaa 180  
 atgccccaaa gaggaaggag ggaacaaata tgaccaatgc ccctggcaga gcaagcaggc 240  
 tgagggtga ggattgagca atgggaggtc actggtgaca gtttactgg agctggatgg 300  
 ggaactagag ggaatgggag gggatgggag gacttgggga cagcagtaca ggcaacagac 360  
 aagggggcct gctgtaaagg gagcagataa atgggattgg agccaaatga agaaggggag 420  
 tgtcaagaga glgctttact tttaaatgg agaattagag tgcattgtgc actggtgggg 480  
 ggatttgatc tcttagggag agaacagtgt tagggaggga gaatgcagga tagctggggg 540  
 aggggtgggg gcttggcccc agcagagact caggacactt gggaagtga gcttccctgg 600  
 gcttccctc ctctcctgtc tgcaaggggt cagtgggctg agatttcagc acttaagcaa 660  
 agcatttgct cttggcccca gagaaaccgg gctggctgtg gtctcaggaa ggaaggaggt 720  
 gtccaggctc aggcctgggc ctgggtttca gggaggggcc acgtgggtca ccccttgacc 780  
 ctctctttca gcaaggaagt gatcctttct ctacatgggc ctacacttgg ggaggacaat 840  
 ggtgtctttg aagttgtagt aactgaagta gagatcaaaa ggcaatgcag atagactgac 900  
 agatttcgcc tgaagagggg aagcccgacc aggtaataaa ggagtaagag gaaggatgtt 960  
 aaggacaatt ttaggaaca gataatgagt gaatatattt tctctctctt tcccaattta 1020  
 aactgaagca ggagaaactg aagctagaca taatgattaa cttcccaagc tggtagagctt 1080  
 cctgagctgg ttagtgagaa cagcactaag gccaggttct cctcccaaga tgtttaagat 1140  
 gagacaggac aatgcctgct cagagacagg gcctggctga attggccctc aggattctct 1200  
 ctgctctgag gtttctgaa gaaggccagg gcagaggtgt ggtgatgtag ctgctgggag 1260  
 gacagagctc cgagtcacgt ggcttgggag ggcctccctc tcctggtgtc cacagaagcc 1320  
 caacgtcact agctgggggtg tgtatggctc acacgtaggc caggctgccc taggcttggg 1380

```

gtgcaagggg ggggccccta cttacttgtg gcctgtcccc tcgtgaatgt gtctcatgtc 1440
cccagtgggg tttttcagtg agggcatagg tctccaggat gcacaaggct ttgtgccaga 1500
attgcttgga attgcctagt tctggaaggc tggttggcca actctggcct ccggcttttc 1560
ctttgggaat ttcccttgaa ggtggggttg gtagacagat ccaggctcac cagtcctgtg 1620
ccactgggct tttggcattc tgcacaaggc ctaccgcag atgccatgcc tgctcccca 1680
gcctaattgg ctttgatggg ggaagagggt gggtcagcct ctcacgatga ggaggaaaga 1740
gcaagtgtcc tcctcggaca ttctccgggt aagaggagca ggcattgtcc cgtcccagct 1800
tgatcctcag ccttctttca tccttgcccg cgacatgtc ccaggcctgg ggtcagatgg 1860
ggagtgtcga ctctgtttct gggctgtttt ctggggagaa tgggtcggcg ggtttttttc 1920
cccaggacct gggcagggtc aatggtgggg gccgtgtcg catccttggc tgggttttcc 1980
acagctgaga accactccag ggccaagccc agagcttatt ctaccctttt ttgtcctctc 2040
ttccctgtc ctgggccacc ccaccctctt ggtcctctg cttagatgtg ggcaaaaga 2100
ggagaactcc ttggcctgag agaactacct tagatcctgg cttcagtggt cctctgcagg 2160
gggttacacc ctctctccca agcagccaga cacacaagta acctcattgc ctcagtttcc 2220
ccatctgacc agcacagggc cccctgtgcc ccagcagcgt tctgagagat tggagctttc 2280
tccttttctg taccttggct accgtatgag gacggataca gagtgttccc cccaccccca 2340
gcccagggga tatttgattc atgaacattc cctcagtgct tttgtggggg acaatgctgt 2400
gccaggtcca gggatggcag gacgagtaag acccaggctc ccagtgggc caggcaggga 2460
gagagacaca taacaacca tcaggaaaga ggtaaaaatcc ccaggccact tggcatctgc 2520
tcccttgagt gtctgggaat gtccctgatt tataaaaaga agctgacggc cctctttgtt 2580
gtccatgcct acaccctttc actttcgttt cttcggggca ctgcagcagc cctgttccac 2640
agaccccatg acaatcgag aactgaccat gctgagagat tttcttggct gctcagggac 2700
cctgccaggg cttgaagctc ctggagggtc acttgcctc aaattcccag aacgcacagc 2760
aggctactga tgatagcagt ggcagcagtc tgtgcacggt ggtttcagag gcgtgggagg 2820
gaggtgaggg ccctagggca agtgtgtgtg ggaagtgttg atgggggaca aggcaccaga 2880
acgctcggaa acaacttagt ttgcaccgta atttttcact tcgcctagga caggaccttt 2940
agagcaatat tctgagtcta ccccttggag tagcagtggt caaaacacac agcacgggct 3000
tgggggcccc gtggggaacc caaatgtaag agttagagac atgcattccg gagtcataca 3060
tggtcctgtg tgaaatcctg actctgcctg tctagctgtg acacatcgta caaatcactt 3120
agcttcttgg tgccctcagt tcttccctct tagaatgggt agatcatagg cactacttca 3180
gagtggctgg gagggttcag tgaattcctg caggagagca cttagaatgg cacttggtgt 3240
gtagtttatg cctaattaat attagccgtt actgaaactg ctgtagcctg aatccagcca 3300
gcatgaaaga gcccctctca ccctgcttcg aagagaatga attccctgat tgtttggaag 3360
atctctctct ctctctctgt cttttttttt tttttttgag aaacgggtctt gctctcttgc 3420
ccaggctgga ggcgaatggt gccatcttgg ctactgcaa cctctgcctc ccgggttcaa 3480
gtgattctcc tgtctcagcc tcctgagtag ctgggattac aggcgctcgc caccacgcct 3540
ggctaatttt tgtattttta gtagagacag cgtttcaccg tgttgcccg gctggtctag 3600
cgctcctgat ctcaagtgc cttgggagat ctcttgctcc taatattacc tcaagccttt 3660
ttaaacgttt taagccggag accaagcatg gatattggg ttaggggtct tgatttaatt 3720
cttggttgct tcaaaactct tggaaccttg aggtgtttct tgccctctct gggctcctca 3780
tttcacatct atatggtggg gagcttggat tgggtaatgt ctgaggctag aacatggcc 3840
aactcgggtt ctgctggggc tgacttgccc tggccttccc tgaccacct gcacttggt 3900
tctggagaag tccctcactg acctgtttct cctccccagg ttgtgaaatg tgctcgcagg 3960
aggcttttca ggcacagagg agccagctgg tcgagctgct ggtctcaggg tccctggaag 4020
gcttcgagag tgtcctggac tggctgctgt cctgggaggt cctctcctgg gaggactacg 4080
agggcttcca cctcctgggc cagcctctct cccacttggc caggcgctt ctggacaccg 4140
tctggaataa gggtaacttg gcctgtcaga agctcatcgc ggctgcccaa gaagcccagg 4200
ccgacagcca gtccccaag ctgcatggct gctgggaccc ccactcgtc caccagccc 4260
gagacctgca gagtaccagg ccagccattg tcaggaggct ccacagccat gtggagaaca 4320
tgctggacct ggcattggag cggggtttcg tcagccagta tgaatgtgat gaaatcaggt 4380
tgccgatctt cacaccgtcc cagagggtga ggcactcctg gtgtgcatca cagagttctc 4440
aggaaaaggg tcttagtca ccaagactga tttgtcctca tgaagtgcg ctgtggggta 4500
acttggtccg tgggatttcc cctaataaagg tagccaggca ggtaaaaatt gctcttgact 4560
cttggcagga aacatacaac tctttctttc ttcttttctt ttcttttct cactctgtta 4620
ccctggctag aatgcagtgg cacaatcata gctcactgta gccttgaatt cctgcgctca 4680
agtgatcttc tggccttaga gtagctggga ctacggctgc tgtaccacca tgaacagcta 4740
atthtttttt tttcttttag agatggggtg ttgctatgtt gcccaggctg gtctccagct 4800
cctggcttta agcaatcctc ccgcttggc ctcccaaact gttgggattg caggcatgag 4860
ccactttgcc tggccaacag aacacttctg ccgagaggaa gtgtgtgtg gccaggaaact 4920
cagattctgg agccagaatg gtgcaggctc aaggtcaacc ctgtgtgatc tcaggcttcc 4980
ctatggagcc tctccagcct cagtctccct tgtttcagtt tctcatcta caaaacaatg 5040

```

ttaatagtc	aatgggtgc	atcctataa	gctcttgga	ggattcagt	agttaattt	5100
agtaatgct	aggatagtg	ctattaccac	tggtctgtat	ttattatttc	tggtatgag	5160
gatactctgt	acttgtagac	ttttatttct	gtctgtttta	aattaacagc	acaacagacc	5220
ataacactgc	agtatattga	atttatttta	taattaacat	agcatattat	aaactaatat	5280
agcttaaat	tttatgtagg	atttctgaca	tgaaattgca	ttagatcata	gatgttcaga	5340
gttggtatat	aacagccct	gagaatgtag	taactcagca	gagaccagaa	ggtcagagaa	5400
atgaccactg	agtatttttg	aaactctttt	gttttcttcc	aaatagtgat	tcttagggct	5460
cctgagaggc	agatggaaca	atcattaaca	ttccacttta	taaatcgga	agttgagacc	5520
aaggaaagta	gtttgaataa	gctcacagta	gttaatgagg	gggccagtgc	tggaccaatt	5580
ggccagcact	ggtcattgac	ttattcatcc	atcattcatt	tattcagcca	gaatctatta	5640
gggtgctcat	acatatttgc	ttaaagtttg	ttgtgttcat	agagctttgc	acacggtagg	5700
tactccataa	acatttggtg	atgaaataag	tgagttactg	aatgaatgat	tgaattagaa	5760
tgacactgca	gtgttaaaat	gggctgggtt	ggggaacatt	ttagtttttg	ttttgtctg	5820
ttttccaaaa	atgtatgtgt	tggtcacatg	agcttgata	accctagatt	gagattgatg	5880
acataaataa	atttgtcttc	aaggctgcac	taaagctggc	tcacatggct	aggtatttac	5940
agagcagaag	tggtgcagtc	ctctctgatt	agttgcacgt	acagaagaca	tattcgttat	6000
tggactgacc	ttagtttctc	ttataatttg	ttaggggaat	tgaatcagcc	catctgagaa	6060
gttacaagat	tgtgtcttgt	catctttaaa	agttcagcaa	tgtgatgtgg	tacagatggt	6120
ctgaggggtt	tgggaaggt	agcctagatc	cctagggccc	agagaagaca	ggatgtgaac	6180
agaggaagta	ctaggattgg	tgaagaaaag	aaatgggata	actcatgggt	caaagaagaa	6240
atcatgatgg	aaatcagaaa	atattcagaa	ccatacaata	atgagaatat	tatttatcaa	6300
aatctattgg	atgcagctaa	agcaggacat	agggggaaat	ttacaacctt	aggtgcctag	6360
attaggaag	aaggaaggca	tttgtttatt	tattgtttta	tttatttatt	tgagatgggg	6420
gtctcactgt	gtcaccagag	ctgctggagt	gcagtagcac	gatcataaat	cactgaagtc	6480
tcgaacttct	gggctgaagt	gatcctccc	cctcagcctt	ccaagtaggt	gggacacagg	6540
ctagcaccac	cataccaggc	taattttttt	ttgttagaca	cagggtcttg	ctatgttgag	6600
gtctcaaaact	cctgggctca	agtaatcctc	ctccctcggc	ttcccaaagt	gctgggatta	6660
caggcatgag	ccactgcgcc	catctaaggc	tgaattttaa	tgagctaaga	attcatctta	6720
agaaagggt	aaatagacag	caaaagcaaa	cattgaaggt	tgggactgag	ctgagtggtg	6780
agcagggatg	ggagacaaca	gatctgagga	gagcaggaga	ttttgaaagg	attgcactgc	6840
ctgaggttta	agcctttaga	atccagctct	ctctgagctc	cctttgagct	ctgacattct	6900
gtgactctga	tttgggtggc	ttcccttagt	ggccttactg	atttcatttg	gatggtgctt	6960
gtggtatatc	caaccaacat	gtcttcccaa	atggcctttt	aatttcctat	aaagaagtag	7020
ttgtcattga	tttcagggtta	gggacagaaa	atgctgtgga	atgaaacaaa	atgcaagtta	7080
aagaactaaa	ttccaaaaat	acccattgct	actattgact	gagtgaattc	ctactgtgtg	7140
ccagacactg	taccagtgcc	attccctgta	ttgttttatt	taagcctcac	aagggtatag	7200
tgtgactaca	ctgtttctta	acaatgaaga	aactgcccaa	atcgcccatc	tgggaagcgg	7260
cccagctaga	atttgaatcc	aggcctgttt	tcctccagag	cttgtgctat	tctctgtctg	7320
tcataaaatg	tgggggcttt	gtgtggtaaa	cttgtcaggt	tgggcatagc	agttgttagg	7380
aaacctgagg	ctggtaacac	cagctgtaat	accagctgtc	cgtctgactc	atgcaactgt	7440
taaagttgat	agggtgagg	tgtagcactg	agctctgaat	tgccctgattc	ctataacaat	7500
attaacttaa	acatttttta	aattgggaaa	tgcaccatgc	atacagaaga	gtgtgtatat	7560
ttcatatgta	tagtgtaaac	tgttcccatc	accaggtta	aaaaacagga	tggtgccagt	7620
acctggggcc	ttctttaact	gcaactgcta	gaggtaaaca	ctggcttgac	ttttgtgtaa	7680
atcatctctt	tgcttttctt	taatgtttta	gcactcttta	aaataaatcc	ccaaataatg	7740
tattgttcta	ttttgaaaaa	ctgagtagca	agccaaaaat	agctgtgtaa	agaaaggcca	7800
cttaaattag	ctgggtgca	gtggctcaag	cctttaatcc	cagtactttg	ggaggctgag	7860
gcaggtggat	cacaaggcca	ggagatcgag	accatcctgg	ccaacatgga	gaaacccctg	7920
ctctactaaa	aatacaaaaa	attagccaag	aatagtgcca	tgtgcctgta	gtcccagcta	7980
ctcgggaggc	tgaggcagga	gaatcgcttg	aaccgggag	gcagatgttg	cagtgcagctg	8040
agatcgact	gcttgaaccc	gggagcgaga	gggtgcagtg	agccaagatc	gcaccactgc	8100
actctagcct	gggtcacaga	gcaagactct	gtctcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaagaaag	8160
gttactattg	ctttttctta	gatgaagggt	cccaaggcag	ggaaagctaa	gtggagtctc	8220
agggacttgg	tctggctttt	ccttcctggg	gaatttataa	ggacctcttc	tgggaagtca	8280
gtcggcaatg	ccatgaatga	gtctggggaa	atattgggct	cattgcaact	ggagggtctg	8340
gtaggactga	tgtgaattag	gtgctgtgtc	cggaggaaaa	tggccagagg	aagtgggctg	8400
ctttgtacag	tcagtgttaa	agttgccaaa	ggctattata	gctcacagga	atgggccaag	8460
gctaaacact	cctgtggagt	gaaatgaatg	tcctcagctg	actgaggcag	cgggagttag	8520
gaagaacga	tattagtcca	tggtgaagac	aagtcaaata	tagataaagg	ttagggtcag	8580
gcttgcttgg	acacttagga	gataactgcc	ctcaacttgt	ttgaatcttg	agtcactgct	8640
ccattttgtt	tgaactgggtg	gccatctact	tatagtatac	agccatcaac	ctgagatttc	8700

cctacatggt cttcctgcct tgggtctcctg tatectgaat cctatggcct cttcttccct 8760  
 gggtttactac attttgctag accgtatcct ccagtcaatt ccttagaatg aatgtatgaa 8820  
 agttaaatt tctgaggtct cacatgtcct aaagttccct catactggat tgatagtttg 8880  
 gctgggtata aaattctggg ctggccatca ttttccttca gaattttgat tgcattattc 8940  
 cattatcctc tcttttcaat attgcttcta agaattccaa aacctttttt ttttttctt 9000  
 tttgagacag tgtctcactc tgtcaccag gctggaatgc agtagtgtga tctcagctca 9060  
 ctgcaacctc cacctcctgg gttaaagcga ttcttcttcc tcagcctcct gacgagctgg 9120  
 gattacaggc acccaccacc acaccttta gtagagatgg ggttttgcta tgttgccag 9180  
 gctggtcttg aacttctgac tttaggtgat ctgcctactt cggcctccca aagtgtggg 9240  
 attaaaggcg tgagccacca caccagcct ccaaaaccat tttaaaactc tttctggaag 9300  
 cttttaaaat tttcttttag tccccagaat tttaaaattt caattatgtg ccttgggtgtt 9360  
 cttccattat attagtacc caagaggtag tttcaatctg gaaacttctc tatgttttg 9420  
 gaaatgttct tgattagttt acaggtgatt tcttctctc cattttatct cttctctttt 9480  
 catgaaacta ctattaattc aatgttagaa ttccttgact gatcatttaa ttttcttcta 9540  
 ttttccatct ctgtgtcttt ttgtctact tttctatgat agtcacagct ctatctttaa 9600  
 actcttgagt tttcatcttt tgatgtcatg attttaattt gcaagaggta ggtttgactg 9660  
 attctttttt gtagtatctt actcttggtt tatggatgca acatcttctt tgacttaagg 9720  
 atcataagat aggtgggttc tttgtttggt tgtttgactg tttttcacc tatgtaaact 9780  
 ttttctacaa gtttctttcc ctttcccccc tttttggctt ctatctccca cattagatgc 9840  
 tttctctggg ctcatgatac tctttgtttt ttttctcaa gattgacagg taggacttta 9900  
 aaacttggtg agcatgcggg tgaaacttgt ctacatgaa tttcactgta gatattttg 9960  
 agattgacag tgtttatctc ttttagatctc acctcctggg ttgatcaagt tatctgagta 10020  
 caccacagac cttttgcctg gggataaacc agaaatctgt ttcagaaacc actttgatctc 10080  
 agtcttcctt gttttagtca tttccttcag ttccggagggt ccgtcatgct gatcattcca 10140  
 gagcccttta cagatcctag ggtacacact gcattggttt caactttctt gttttgggg 10200  
 taagatttgg ctttcaggag tctcctcagt ccgttactat tcattcaatc agcaagtctt 10260  
 tgagcacctg atttgtgcca gacattcttc taggtgttag ggatacctca gtgaacaaa 10320  
 cagacaaaaa tctttgtctt ggaaatacac acactccagt caggggagag ggacaataag 10380  
 ccaaagggaag gaaattacag cgtgtgctag aaggtgataa gtgctgtaga aagtaagtaa 10440  
 agtgggtttg ggaagtgaga gtttgggaag gggataaatg atggcaattg taaatagagt 10500  
 agtcagagtt ctacttaga aggtgaaatt caagtaaaga cttgaaggag gacagggaa 10560  
 tagccacatg gatggctagg ggaaggttc caagctgaga ggacagccag agccaaggcc 10620  
 cagaggcagg agcatacctg ctagttttag gaaacaggag gccaggatgc tgagtggagt 10680  
 aagagggggc atgaaaggag aaacttgggt ccagctgggt ctagacagggt atttttgtct 10740  
 gttttgggccc ctgaagggtta ctattggact tggactctta ctctgaggaa atagggacgc 10800  
 tattgggacg tttgtacagg agcaatgtga cctgagtttt gtttgtaaag gattagactc 10860  
 tggtgtgtgc attaaggcta ggtgtgggg gcaggaacag aagcaggggg accagttttg 10920  
 cagcctgtgc agctttccag ataagcaggg attgtggctt ggaggaggat ggtatagagg 10980  
 aggtgacaag aaatgactct acatggagt tccataagc acataataca catcagattt 11040  
 cactagagac ctggctggctc caatgtttaa cgggccccgg gaattttttt cttttttttt 11100  
 caaagactta atatgaaaaa aaaaatttaa caggctggag tgcagtgggt tgatctcggc 11160  
 ttttttgaga cccagtcttg ctctgtcacc cagggtcaag tgattctcct gcctcagcct cctgagtacc 11220  
 tcaactgcaac ctccgcctcc cagggttcaag tgattctcct gcctcagcct cctgagtacc 11280  
 tgggactaca ggcacctgcc accacgcctg gctaattttt tgtattttta gtagtgatgg 11340  
 ggtttccaca tgttgtccag gctggtctgg aactccggac cttaggggat ctaccgcct 11400  
 tggcctccca aattgctggg attacaggca tgagccacca tgctcagcca tatcttgcta 11460  
 ttttctacat ggattacatg ttgaaatggt aatgttttgg ctattgtgga ttaaatagaa 11520  
 tatatgatta aagttgattt catctatttc ttttaacttt aaaaaatatg tctgttagag 11580  
 gatttgaaat tccacatgct gcttgcatct gtgacctgca tttcatttct gtggaacagt 11640  
 gccctttttg ggacatgctt tgaaggtgga gtcaacagga tttggcagat tacagacgag 11700  
 aggttcaag ggtgactcca agacttcggg gcagagcacc tgggaagaaag gggttaatat 11760  
 tagccaagat gaggaaggct gtcggtttgg caggtgcatg ggcaggttag gagtttagtt 11820  
 ttgaatatgt tggaggtgtt tatgaaactt ttaagtggag atggaaaata ggcagttgga 11880  
 tgtgcaagtc cagggttcag ggagacagtt caggctggag atgaagatgt gggagtctga 11940  
 ggagagattg tattcaaata ttcaatccat gagacttgat gaaatcactt ctcttccaa 12000  
 tgatttacag cctgcagaat cattttccct atctttgtag gtttatgtct tcattttgtt 12060  
 tcatttatct ttcagttatt cactgtttta gtgagttttg agtaggagcc agattggatg 12120  
 catgcgttca attcaccatc caacactgta ttaactactt gaaactcatg tgggtgttcg 12180  
 gttgtttttt tgacctttta ttctggatgg aagagagatg cttatgaagt tgcagtaatc 12240  
 agtaagcctt cccacattgc tccatcagcc ttcttggaaag aataatgtct tctgccttcc 12300  
 ctgtaggcaa gaaggctgct tgatcttgcc acggtgaaag cgaatggatt ggctgccttc 12360



```

cttctacaac atgttcagga attaccagtc ccattggccc tgcctttgga aggtaggtgt 12420
atgtttctcag ttaatcagaa agggaagggc agtcagtgc gatccatggt taagagcaga 12480
acacacctcg gttaacatcc catatgctgg cagtatagcc tccctatgac tcaatttcct 12540
tgttttaagg ctagaccac cccgtctcat tgggattttg ggagcattaa aaggacaaaa 12600
gcgtgtaatg ttagctatta gctttcatta tctcccacac agtatactga caattgggct 12660
accatatatt gagggctaac taaaggtgtt acttaccatc caaactctca ttatctgtac 12720
cgaaaagata tggacacatg ttttgagtta gggctggtat ctcttgatct ctgaaattta 12780
gcagctcaca atgggaaact caagaaccaa gtggatctag agactctggt atccctcagt 12840
gcccagggtc accacccaaa ctcaggaaca ggaggggctt ggaccgcacc acttgaacat 12900
accaggcatc ctgccagggt ctttatggac aatgtctacc ctttgcaaca accctgagaa 12960
gtagggtggt tttttttcca ctttatagat gtggaaactg ggcaggaggg ttaagtgcag 13020
agggagggga agatgggtct gattgtaaat tgtccccacc tacactttct cttttcttgg 13080
gagaagaaat gtcagttgta aagagagagt gcaagcctgg cactctttag ggcttggtcc 13140
tacaccactg tagggaaagc tcattggcac tgaagcccc tgagctgtgt gtggtgctgg 13200
cagatgggtc tatcaccctg gactgtgtcc tctgggcagc aagcaagcct gtgggcgggg 13260
tggttggaag tctgtgcctg gcactgcgca gtgcaccgtc tcattgaaga acaggatcta 13320
aacatcagtg cgccacagca ggtgcgcg gacggagtgc aggccctggt ttggcccttg 13380
gttgaggttt gctgttgaca tcatcaagca cagctagtca ctgtaagacc aggccagggt 13440
gcaagattcc ccacacttct aaaggtgaca atgggtgtat ttatttctct ataaaatgac 13500
attttttttt tctggagaat tttagatca ttggtgatga ctggaaaacc tgcacagaa 13560
atcagggtcg aagaggaaga tatatatctg atatgtactg gagaggaaga tatctatctt 13620
atggtcctaag ttcagggtat ctggtatatt cagagggcag aaagctcagc aataatcatc 13680
aactctggga acagaggtga cataaacaca gggcgtcccc tttgtgtgac tgcagatagt 13740
catcagtgag ctcagagctc tatgaaaatt acttgctagt ttttgggttg aaaatagtg 13800
gccagtggtt ggttgggggc agtgaggctg tgatggcggg ggaccatgcc aagctcctac 13860
cagcctggga cgctaaacca gcacttcccc atttctgaa aggggaacta aactctgaca 13920
caggaaatgg tttgcttgca ttactttcag gatgagaaag gaagagcact ggccttccaa 13980
acacaccccg tgcataaaaa ctctccctgc atgggggtgca tggggaggat ggggaagtgg 14040
aggcaggatc acagactctt gtctgagtgc tcagctgggg caccctgggt acccagaggc 14100
cttcccttgc taggtccacc cagatcaatc aggtatctct ccccatctcg aagtttaact 14160
ttatcacatc tcagagttcc ttttgccacg taaggtaaca tattcacagg ttctgagaat 14220
ccggacatgg acatctttg gggctctatt ttgtgcctac tatatccatg aataataatg 14280
ataataagca ccattttttg agagtgttgc atgtcagata ttcttttaa ctgtatttta 14340
tctcgctgcc tctgaaaaa atccttccag gtgtatattg tccccatttt tacagatgag 14400
agaactgagg ccagaaaagg ctaaagtgtc tgcccaagt tatggtggac ccaggttttc 14460
aaactcaggt gtgtctggct tcagagactg ggctcctgag ccttaagcc ctttgttccc 14520
ctttagaaaa agtcacctga ggctgagtgg tgaagggtat tatccaaagc caccgggcca 14580
ctatggcagg acagatatca gaatacaggt ctcccgatcc cageccagag ccccttcccg 14640
tcattctagaa ctctccttg tctcagtaat gataacggca gtcactgatg tcttttgagc 14700
acttactttg tgttgagcac ttacactgtg ctaagcactt gacataggtc atcttagttg 14760
atccgtgtaa aactctgtga ggtagtgaac aacatttctc ccaccttaca gaggtgga 14820
ctgagggtta ggaagtttcc ttgactgtcc tcaaagtgc cagcttgtga atggaggagc 14880
caggatgggc gcccgttggc tctcctatcc cttcagttat gtcagcgtcc cccgcagcag 14940
ccattgtct ggtaggtcc cgtcttccac atggtgccac cttcatctgc ctcttcttct 15000
gccttccagc tgccacatgc aagaagtata tggccaagct gaggaccacg gtgtctgctc 15060
agtctcgctt cctcagtacc tatgatggag cagagacgct ctgcctggag gacatataca 15120
cagagaatgt cctggagggtc tgggcagatg tggcatggc tggatccccg cagaagagcc 15180
cagccacctt gggcctggag gagctcttca gcaccctgg ccacctcaat gacgatgcgg 15240
acactgtgct ggtggtgggt gaggcgggca gtggcaagag cacgctcctg cagcggtcgc 15300
acttgctgtg ggctgcaggg caagacttcc aggaatttct ctttgtcttc ccattcagct 15360
gccggcagct gcagtgcagt gccaaaccac tctctgtgcg gactctactc tttgagcact 15420
gctggttgcc tgatgttggc caagaagaca tcttccagtt actccttgac caccctgacc 15480
gtgtcctgtt aacctttgat ggctttgac ggttcaagtt caggttcacg gatcgtgaac 15540
gccactgtc cccgaccgac cccacctctg tccagacct gctcttcaac cttctgcagg 15600
gcaacctgct gaagaatgcc cgcaaggtgg tgaccagccg tccggccgct gtgtcggcgt 15660
tcctcaggaa gtacatccgc accgagttca acctcaaggg cttctctgaa cagggcacgc 15720
agctgtacct gaggaagcgt catcatgagc ccggggtggc ggaccgcctc atccgcctgc 15780
tccaagagac ctcagccctg cacggtttgt gccacctgcc tgtcttctca tggatggtgt 15840
ccaaatgcc caaggaactg ttgctgcagg aggggggggc ccaaagacc actacagata 15900
tgtacctgct gattctgcag cattttctgc ccccccagac tcagcttccc 15960
aaggctcggg acccagttct cttcgggggc gcctccccac cctcctgcac ctgggcagac 16020

```

tggctctgtg gggcctgggc atgtgctgct acgtgttctc agcccagcag ctccaggcag 16080  
 cacaggctcag ccctgatgac atttctcttg gcttcctggt gcgtgccaaa ggtgtcgtgc 16140  
 cagggagtag ggcgcccctg gaattccttc acatcacttt ccagtgtctc tttgccgcgt 16200  
 tctacctggc actcagtgtc gatgtgccac cagctttgct cagacacctc ttcaattgtg 16260  
 gcaggccagg caactcacca atggccaggc tcctgcccac gatgtgcac caggcctcgg 16320  
 agggaaagga cagcagcgtg gcagctttgc tgcagaaggc cgagccgcac aaccttcaga 16380  
 tcacagcagc ctctctggca gggctgttgt cccgggagca ctggggcctg ctggctgagt 16440  
 gccagacatc tgagaaggcc ctgctctggc gccaggcctg tgcccgtggt tgtctggccc 16500  
 gcagcctccg caagcacttc cactccatcc cgccagctgc accgggtgag gccaaagagc 16560  
 tgcattgcat gcccggttc atctggctca tccggagcct gtacgagatg caggaggagc 16620  
 ggctggctcg gaaggctga cgtggcctga atgttgagg cctcaagttg acatttttga 16680  
 gtgtgggccc cactgagtg gctgccctgg ctttctgtgt gcagcacctt cggcgggccc 16740  
 tggccctgca gctggactac aactctgtgg gtgacattgg cgtggagcag ctgctgcctt 16800  
 gccttggtgt ctgcaaggct ctgtagtgag tgttactggg cattgctggt caggatagg 16860  
 ggagcaccat caaggctaag tgtgggagca ccgagctggg ctctagaagt ctggggccag 16920  
 ctctgcctct gccaccctgc tttgcaacac tgcccagatc ccttcccttc tgggccttaa 16980  
 tttcaatatg tgatgatgac agccacactt tattgactgg cctatgtgct ggtctcgggt 17040  
 ctatgctttc cggaaatgac tcatctaate tctacaacca ccctgggggg taggcaggaa 17100  
 tgttattatc tccattatcc ttgacttgag gctcagagaa gtgaagtaac ttgtccagga 17160  
 aatggcagag ctgggggttca caaattgcat cattctgatt acagggtttc tgccctccac 17220  
 cagtctatgg atacacttca gaggtccctt gaaaaccttg aggtcacttg cagaaagtgt 17280  
 tgtgtagtat gtgtccgtat caggaacaac accaaatcag aggtgacttg tgcccatca 17340  
 gagactttaa caccacaacc agatgggaat ttcaggaccc aagaaataga aagtggctgc 17400  
 agggttacaa ctactgttgg atctctgagg tagcacagtg tccaaacagg atttcagcac 17460  
 taccgtatt gcttagagcc ccagccaaag atgtgaggtt ttgcccttg gagaatctgt 17520  
 gccctgaac tcgggggcct ctttccacat ctggggggca ggcaaggcca gaggggtgtc 17580  
 ctaggcctgc ggatcagcat gcgacagatt ccccaacatc ctccagctt gaaaggggat 17640  
 tgccctgctt ctatttagaa cctataggaa agcagaagtt ctagattgaa gttaaaattg 17700  
 attcccagcc tccaggggct ttgggctaca cctggatgac cttaattgac cctaagcatg 17760  
 ggacaaacca ctctctgaga gtattaggat ggtatacatc ttctctgggg gcaaagcaac 17820  
 aagatttatt tttcatcatg gaccaaacc atggataccc actagaaact gtgtagttaa 17880  
 tttgtttaac cctgacatag ggaccatggt ctttaggtta aagcataata acaacataat 17940  
 acataacata tatagcgaat atatatatgt atatatgca atgaatgtaa atatgattat 18000  
 acccatcatg gtcttgagg aaacagatga cacacttaaa atgggtgttt tgaggagagt 18060  
 ttgaaaaaca gattgtttac aagccatggg caggagttag gaagagttag agggttggtg 18120  
 caggggcctg gggtagttaa cagctggggg agggtagact tgaaggggga aggggaggga 18180  
 gactaattag ctggggggaa ggtatggaga cggctgcctg agcttctgca aagtggaa 18240  
 atactgctt gccctaactc ctcaccccaa ctcttgctcg tggccagcgc ctccaccag 18300  
 ctggaccat caggaggcc gagtgggctg tctgctggag tagtccccag gcatcagcct 18360  
 ccaggagcc agggacgggt agagaagggt gagagtggat ctggccaggc aaatggaaaa 18420  
 cagccagcac caaactctat ttccctagga gggaggatca tgatactttg agtgggaatt 18480  
 tggaaacctg tctgttgagg caatttccct gatagaaata agaattgtga ttttctggg 18540  
 tagtagactc agtttttacc ccaagaggcc aggcactact ggcctgtgtg atcctcatag 18600  
 gccagtccat ctctggaatt ctgaaatgga tcatccatcc ttgattaggg atgtccccgt 18660  
 gattaccagg gtgtgcagaa gggctctggg aaacctgtgg gtctgtctct gtgttcagag 18720  
 aaaggtgagg gtggcctggt tctagctcat ggtgctcaga ctgtggtgtg taaaggcact 18780  
 cgtggcaatg cagattcctg ggcctgcctc tagtgattcc cattcagtag gtttggggtg 18840  
 gggcccagga aatctatatt tttcacagac acccctggtg attctgatac aagtgtctc 18900  
 gccctgggag aactactggt ctgcagcaac cagcttggtt ttccattagc aattactgtc 18960  
 cttagcgag ttttactgct cttcacctta cacacactaa aactgccaag gccgtagggg 19020  
 aggggaagca accatgaggt tgctgtgagt gcactgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 19080  
 tgtgtgtgtg tgatgagag agagagagag attgagaaag agaggaaagg aggaaggggg 19140  
 agggcacagg ctctctctcc acagtgccaa cctgcctctc tcccacttga agcgtttcca 19200  
 tgccaactga aatcctcagc ctctaggaaa ccctatatac acagtgcacc tatataggtt 19260  
 tctttagact ctggctctct cagactctag agtgatggct ttaaaagttt tatgttacc 19320  
 acagagagag agcagcacc accatgtaaa catggaacct aagtttcaca aaatgacttc 19380  
 gctttatgaa ctctgagaca ctctgctctc ttctgttctg ttctatttcc attttagaaa 19440  
 tgctgtcag gaccttcaaa atgatttgca tgacctgcaa cctgcagtct gaaaaatcac 19500  
 tgactacag aagtggccat aagaggccct gagggagaag ctgcacaatg tcatggttaa 19560  
 gagtggggtt tggagccaag ccgcttaggc tcaaagcctt tatgtgccgt acaaccttgg 19620  
 caaagtcact tcgcttgtct gtgcctcagt ttctttctca cgaatgctca taataatggt 19680

tccccatttca ctggccttggt gtgaggtatga aatagtgtta ttattgagaa gtggtaaggg 19740  
 tagtgatcag tgctagcgat catgattcta ggtgactttt actgtgtacc ggggtgctcac 19800  
 aaggctttat gtgcacagcc tgggtagget gataatacta ttgttcctc tttttttttt 19860  
 ttggaaacgg agtctcggtc tgttgccca gctgggggta cagtggcaca atctcggctc 19920  
 atgcaatctc tgcctcccg gttcacgcca tctcctgcc tcagcctccc aagtagctgg 19980  
 gactacaggg gcctgccacc acgcccggct aatttttttg tatttttggg agcgacaggg 20040  
 tttcactgtg ttaaccagga tggctctgat ctctgacct cgtgatccgc ccgcctcggc 20100  
 ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgag ccaccgtgcc cggcctgttc cctcttttat 20160  
 agatgaagag accagcaaat aactagtaag tcgctgatca ggatcacaa atccagctga 20220  
 ggcactccag agcctgagct gtttaaccatt cagtcagggc ctcccaagt tgcctaaaga 20280  
 taaagaatca tgtgcacagt ttgtaaaata tacagattcc tgggccccac ccgcagata 20340  
 cttgattgcc agctccaggg tatgggcctg agaactctgc ttttagggaa gctttcagat 20400  
 gatgttgtga tcaggtgagt tttgggaatg gtgccccaa aggagtggca gacagggctt 20460  
 gctcggcagg gactagcctg ttggagtggg gccattgggg ttaaggactg ggcagcaggg 20520  
 cctcactaac cacagcctat atgcctgttt ctgaagtttt ggccactctc atccagctgg 20580  
 tctactgtct gctgacctag atgatggtaa attgtcccca ggggtagcct gtctagtcca 20640  
 ggtgcacct ttcgcatata tcagctcctt tccaccatca tcccccttgt gaggtgctg 20700  
 tgattatcat gttccttttg cacagatgga aacattgcct caaatagct ctgtcatttc 20760  
 ctaaggattc cagggttcct cctggccag ggaccgtggg gtctccactt ttttggggg 20820  
 catagtgcac cacgtcacct ccctggccag ggaccgtggg gtctccactt ttttggggg 20880  
 ctccatctat gcagggtttc ctggaagcac agatgctggc acttcagga tgaatgaaag 20940  
 tctttttggg ggattttgtag atttttttct tgtcttacta gctccatttt caaatgtatt 21000  
 tattttgtct ctttagtttg cgcgataaca atatctcaga ccgaggcatc tgcaagctca 21060  
 ttgaatgtgc tcttctactgc gagcaattgc agaagttagc gtaagtacgc ctgggctgtg 21120  
 gacaatgggc tccaagtggc ctggctcac cccaggtcgt gcagcctggg aagctgtgag 21180  
 tgatgggctg gggcaggggc tgtttgcatg atgggggggtg caggtgattc ctgcccagag 21240  
 gggaagggca accctgggat ttggtgctca ctgtccaatg tgctttgctt ctgtgtctcc 21300  
 tctcttctgg aactgaacag tctattcaac aacaaattga ctgacggctg tgcacactcc 21360  
 atggctaagc tccttgcatg caggcagaac ttcttggcat tgaggtgagc ccagggtttc 21420  
 cttattccct ggaaactatt ttttgcacca ttcttgagtc agtctgatct ggtcttggcc 21480  
 tggcactgcc cacactggct cctgacctcc tgattgaatg cagggacagt gtctcatttt 21540  
 aagcaggggt tctctaattg tgtgatctcc ccagtaaaact ctggactagc tctgctgagg 21600  
 acttctgtgc ttttgacct tagcccgtag gggaagaaag cttttctagg cccctttcct 21660  
 tttctgtgct taagagtgtc acagctttct ggggttactg agttccacga tgcattgtga 21720  
 gctcgtcctg gtgggggag catacacagt tacttgccac cccagctgtg gcagcgagtt 21780  
 gctgcaacac tcccaggagg tcccttcacc actcagagca tgcaagggtt gcagtccatc 21840  
 tggttctgca tttctgctac tccagtgtct cccagtttca acaggagtct ctctctctcc 21900  
 tacctgatgc ctttaaattg cccctctagc tggcgcgtgg gttggcctgg cttctctctc 21960  
 cttctctctc tctcagatat tcttgctcc tgtgattgtg gaggcagtaa aaaaagacaa 22020  
 agtaaagaat tgcttccatc tattctttta cctcttgggc tgggtttgtg gatgggagcc 22080  
 gccattttaa aatggcgggc cacatagctc agtctcggca agggctactg agatcagaac 22140  
 cacaggtgcc aattttgtaca aaggactcag tctgtctacc actgctgat ccctcagact 22200  
 cacaagcctg gaataggctg tggccagacc tggctggccc atccctgaga aggggtgctag 22260  
 tttcagaaat ggaggctgag tttgtggcca acacagtagt cctccggtat gtgcaggaga 22320  
 gatgttctaa gacccagtg gatgcctgaa accatggaga gtatcaagcc ctacacatac 22380  
 catgcttttc ccaataccta cacacctgca ataaagtga gtttataaat taggctcagt 22440  
 aagagagtaa tagcaactca taataaaata gaacaattat aacaatcaat atactataat 22500  
 aacactatgt gaatgtggac tctctccatc tccctcaaaa tatcttcttg tactgtactc 22560  
 acccttcttc ttgggaagat gtgtggtggt aaaatgcctg tgtgatggga ggaagtgagg 22620  
 tggatgacgc atgcagcact gtgctctagc gctgggctgc tgttgacctg accacacttc 22680  
 agaaggagaa tcatctgctc ccagagatcc ctaatctttg agcaacaatg aggtcggcag 22740  
 ctggatgtca ggagcagacg atcttgatga ttacaaatg ggagcgtata gacgctggat 22800  
 gcgctggacg ggggctgat tcacgtcctg ggtgggatgg agctggatgg cacgtgatca 22860  
 gaatagcatg caatttaaaa tgtatgaatt gtttatctct agaattttcc atttaatat 22920  
 tttggactgc agttgatttc agataactga aaccatagaa ggcaagctg cggataagca 22980  
 gggggcaggg attaccgtat atcattgtaa tagagagcac aggtctctgga gccagactgc 23040  
 ccgagggtttg aaccctcatt agctcgtgga cctcaggtca gcccaatgtc tgtgtgcctc 23100  
 cgtttccct tctgtagaat ggaggtata accctggcta cctcacaggc tgtagtgatg 23160  
 agcaagcaag ttaatccaca tgaagggtcg caccgtctgg caggggcttt atatagtaag 23220  
 cgagtggctg aaagatgatg ggtaaatcac acaagcactc agcttgtttc tccttatgtg 23280  
 agtccggctc tccaagcagg gattcaatgt gccaccatt tattggggaa aagtcctaaa 23340

aggggaagtg	gggaagggag	ctgggggagg	ctgggaggtg	tgtccctgag	tgaaggagag	23400
aggggaaggaa	ggaaggttga	gactgggcac	cttggacttc	agtgcagtcc	taagacatct	23460
tggcaaggct	gatgaggagt	tcttgaacca	aattcaccag	gcaggggagc	ctgatgtctc	23520
aggcaggggc	tggcaagtgc	agatgcgagg	atgttagatt	ttggagcaca	gcagctgggg	23580
cccttggcta	cctccaagga	gctgaggctg	gagacctgaa	aggcgagttc	tcctagctgc	23640
cacacccctt	ctccaaggat	acaataatat	ctgccttata	ggattgttgt	gagctgagtg	23700
gcttgacgtt	ccttgaaaaga	atgaaagcgt	atagttatcc	caggaagcct	agggttgacg	23760
gtgagagctc	tggggcttct	ccgaagctct	ccgaggtgtc	tggattcagt	tgcagcagga	23820
gccttccttg	ctgggatctt	ccccacccc	tagccttggc	cctccctctc	tccttccttt	23880
ctggaaggct	cagtgggccc	caccctccc	tccagccacc	tggacctgcc	cagcgctctt	23940
gtgcaacagg	taaagcctac	ctgtagcaac	aacagatctg	ggaaggctgc	agagggcacg	24000
atgggggtctg	gatcgagggc	ggctgagacc	agagggaaag	gtgtgaccct	gagtcaccct	24060
cgctgtcccc	gggaaccac	ctcccaggac	ctgcctctac	tgtggctcct	gcctggaatt	24120
gtcacactgc	tgtgcaaaca	gcgtcccgtc	gcccctttcc	ctttgctggg	ggaaaatgaa	24180
gttgtgggag	ccgctgagta	aactagacct	agcagcgagg	gcacctgatg	tggctgctgc	24240
ctccccggca	ggtcttcaat	gctttcttcc	tgtgtttccc	tggccagggc	acagacggcc	24300
ctccttttct	gcctgccgct	gtgttctctc	agcctcctct	gtcttccctt	ccaggctggg	24360
gaataactac	atcactgccg	cgggagccca	agtgtctggc	gaggggctcc	gaggcaacac	24420
ctccttgcat	ttcctggggg	aggttggtt	ccaggaagag	ggacctgcat	ggaggggctt	24480
gggacttttg	aggatttagg	ggcaggtgaa	actcttcagc	caggaggccc	cagaggcagc	24540
ccagctccag	tggggaggac	aagccaggga	gagagtgggc	ggcccttgac	tgccaccttc	24600
atacttggtc	tatgcctgac	aaacaggaag	tttgggatgt	tggggctagg	ggaggacagt	24660
gcccacgagc	tggtgacagg	aagccctctg	atcctcaggg	ggcgctaggg	ctgtacttta	24720
gctgcatatt	aaaaccacct	ggaagcttct	aaacactatt	gccaggcctc	ccaccccaga	24780
ctgatgaaat	gcaaatactc	aggtgcaagg	cccaggtatc	aggagtttta	aaaagcttcc	24840
caggggatgt	acagccaggg	gtgaggaccc	ctgacctaa	aaagagaagg	aaatggggaa	24900
ggataggaag	gcacccaggga	taagaggggc	tgtgctaggt	ccctcgagc	tcttgctccc	24960
tgtaggacca	tgttagggcc	tgccagggag	gggagtaccc	caacctgcag	ccccaggggtg	25020
ggcttcctct	gtttgctagg	caccagggct	tgcacctgtg	ctgtttccag	cagcctctct	25080
cctatcctgt	catgccctag	tgtgaactgg	agtccatttg	acaagaactg	ggagttttag	25140
aacctgggac	tgtaggaaga	gagaataacc	ttagggccta	ggtgttccag	cccatttcac	25200
agggaggcaa	gttgccccca	agctcagttt	tttgttttgt	tttgttttgt	ttgagatgta	25260
gtctcactct	gttgcccagg	ctagagtgc	gtggcacgat	cttggtcac	tgcaacctcc	25320
gcctccttgg	ttcaagcgat	tcacctgcct	cagcttctca	agtagctggg	attataggca	25380
cccaccacca	cgcccagcta	atttttgtat	ttttagtaga	gacaggggtt	caccatgttg	25440
gcccggctgg	tcttgaactc	ctgatctcag	atgatccgcc	cgctcggcc	tcccaaagtg	25500
ctgggattac	aggtgtgagc	caccgcaccc	ggcccccaag	ctcagtttga	gccacaaatg	25560
ggactatggt	gctctagaaa	tcaacatctt	ttccacactg	cattagtagc	aacagagtct	25620
agaacaaagg	aggccacagc	ccactgaac	tctcttctgc	ttgaggtcac	atctgccaca	25680
tcaggggtat	ttacctcttt	caacacatat	ttattagggc	acctgtctgg	gccaggcggt	25740
gtgctaaaac	ccccaaacgc	tgtcatatga	tacaaagtgt	tctgtaactt	gcttgggtttt	25800
tttttttgtt	tgtttgtttg	ttttgttttg	ttttgtttgt	tgtttttttt	tgcttcgcca	25860
tatattatag	gaattttttt	aggtcattat	gacctcttta	tttacttaat	tatctattta	25920
tttattttac	taatatattac	agaaagggtc	tcactctgtc	acccaggctg	gagtgcagtg	25980
gttgcaatca	tagctcattg	tagccttgaa	ctcctgagct	caagtgatct	tcctacctcg	26040
gcctcctgag	tagctgggac	tacaggcaca	agccaccatg	cctggccgat	atttttatgt	26100
tttgtagaga	cggggtctca	ctatgttgcc	caggctgggtc	tcaaactcct	gggctcagg	26160
gatcctccct	cctttgcctc	ccaaagtatt	gggattacac	aagtgcagca	ccttgctcag	26220
cctgacctca	tttttcaaag	agctgcagag	tgttacataa	tgtatttaac	tggtcacttt	26280
ttgatgacta	ttaagttggt	ttcaggtttt	ttgttattac	agtgtcatat	ccctggggca	26340
cagagcagtg	ctggcacata	gccagagctc	aatcgataca	tacctaata	atgaaagtac	26400
agtggaatc	ctaattcagc	cattctttgc	taacttgtgt	acatacctgt	ccagggtagg	26460
tccttagaat	acagtcaata	agtcagaagg	tgtgagttgg	gatctacctt	ttggaaaggg	26520
atgttttcaa	actacagtga	gtcagaggag	gatggcccag	aagctggggg	agttgaagct	26580
gatggcgatga	aggaattagg	ggtgttagga	agaagcagga	gataaagagc	tagcttgacg	26640
aagaagtgtt	agacttggtt	tgggcaggta	ctggagggtg	gctaaggact	tgtgggtggc	26700
agttaccagg	aagcgtatct	gaactaagtg	tcagaaaaag	tgtcacaaact	gtaaattact	26760
cttgtcagtg	agttcctgtc	cttaagggtt	agggctgggt	agccctctac	tattctctaa	26820
gtctgtaatg	taaagccact	gaaaactctt	gggttaagtt	tggccatccc	acccaaaaga	26880
tggaggcagg	tccactttgc	tgggaccagg	agccccagtg	aggccactct	gggattgagt	26940
ggtcctgccc	ctctggctgg	gactgcagag	ggaggaggac	tgttagttca	tgtctagaac	27000

acatatcagg tactcactga cactgtctgt tgactctttt ggccttttca gattctgggg 27060  
 caacagagt ggtgacgagg gggcccaggc cctggctgaa gccttgggtg atcaccagag 27120  
 cttgaggtgg ctccaggtaa cttcagagtc tctctgagcag ttttcttggg gagatcaggt 27180  
 gaagaggagg gagctggggc cagttctgaa ggtctttgaa ctttatttct accccacaat 27240  
 gttaggcaat ggagtaagga aaaaagacca ttggatttca agagaggaca cttgagtcct 27300  
 tctgggtgac ttggaaatgt cccttgcct ctcagggttt tgatacagta tctgtaaatt 27360  
 gaagatatt ggctggatca ggtacatttt atcttaaggg ccaattccaa tccattggtg 27420  
 gtgggtgccc agtgaccac attaaaaga attctaaggc tgcacctggg cttaaagaag 27480  
 agcactataa tcaattagtg atgtctaaaa aagctaaaaa aaaaaaaaaa gagcactgca 27540  
 ttcaattagt gatgtctaaa aagggtagaa aaaaaaaaaa aaagaaaaaa gaaagagcac 27600  
 cgcaatcaat tagtgatgct tgaatggag cagaccagga gagcaccacg aattttgccc 27660  
 tccataggtt agtcatctc tgaggtcttt ccctgctctg acatactttt gttccatgat 27720  
 tacctccagc ctggtgggga acaacattgg cagtgtgggt gcccagcct tggcactgat 27780  
 gctggcaag aacgtcatgc tagaagaact ctggtgagtt tgggggattc tctgctctgg 27840  
 ggaagtggat cacaatctct gttgatcccc tggcctcatc cataggagcg gttgtgtgga 27900  
 cagacaaagg tggatgattg agtgattgac tgattgattg attgtgtttg tctttatatg 27960  
 tactgagtgg tatgaagctt atagagcctg gtatgtacat gctaattttt ttatttaata 28020  
 aaatatatgg agtttgggt ttggtgactg cctccacatg gcataagtgt taagagcaca 28080  
 gactctgtaa tcaagcaggc ctgatcttta ggcaagttaa ataacaattt cagaatctca 28140  
 agtttcatgt ctgtaaaatg agggtaagaa tacttccaac cataaaggat ttttgcaaga 28200  
 attagataaa gtatgcctg tgaagacctt aatatagtcg ctggcatatt tgtaagtgt 28260  
 ccataaatgt taaattagaa taatggcagg gttactacta ctattactgc tgctgctgct 28320  
 gctgctgctg ctacaactac tatagtactg tgactactac tactaataaa gttttgttat 28380  
 tttaaagtga ttttgagttc ctaggagcac tgggtattca agtcttaggt cattttggaa 28440  
 ggtgtaattg agttttgata gttgaaagag gaaccatgaa tcatgcttat actgttgacc 28500  
 tgaagcagat tctaagtttc tcatccttta gatgccacta gtatagtttt ctgacatgtt 28560  
 ctgggcagct tcagattatg tcaggggagat aaaatactga atgtttgatt ttcccgggaa 28620  
 gcagaaaggc actgcaacat atgggcattg ccataaacag attttatgga tggaccttg 28680  
 ctgttgacag gcttactagc tctactcaag tatgattgat tctatcctga ctggattttg 28740  
 ccacttgaa tttcttagta gaggagaacc ttgttatgag agcatcagtt atgattactg 28800  
 ttaaaagaaa aacttttagc aaattaaatt tagcagaact ggtttgaaca tacagcaatt 28860  
 tatgaattgg gcagcaggag gaactgggag tgctccacc agcaaggtag gcaagcagta 28920  
 tctatagaca ggaaaaggaa gtgatgtaca aaacagcttg attggttgca gctgggcatt 28980  
 tgcttcttat gggcatggtg tgatgaggca ttttctttat atggatatag actgatcagc 29040  
 tggtagactg tgactgactg aagcctggct gctgtgattg gctaagactt agctgtttgt 29100  
 tataaggata tgttggttag ttgcagtttg ctacatagga actcaaagta cagaggcagt 29160  
 ctccaggcaa atttagttta actatatgtt aagctgcagg tgacagaata cctccatcta 29220  
 tagaggttta aacaaggaaa ggggtttatt tttcctgtat aggcagctgg atgtaggcag 29280  
 tgtagggttt gtacagtggc tacaagaggc caggagggtt ctcagctctg tctcattctc 29340  
 ttctgttcc atcatcctta gcctgtaact tcattcacat ggttggtgtg ctcatgatca 29400  
 caggatggct gctccaggtg cagcactact tctgtattcc cggattcgat ctatataccc 29460  
 aggaaagcca tctgggttct ctcctttaa aagcattcct ggaagcccca cctgtcgact 29520  
 tccccttatg tatcaaccat gtgtatgtca cttgaccaac ccacttgat gttgtttgac 29580  
 cagccttggc tgcaatggag agtgggaaat acagttttt caccaagtgc atggctgtcc 29640  
 aaatgaaatg agacttccat taataaggaa gaaaggaaag atggagatca ggaagctggg 29700  
 ggatcaggga acttattaca ttgagagccc ttggagtga ttctcttgca aatatgtccc 29760  
 tggaaattgag aatccccaca acgtctttat ctgttcttcc tttatccatg agtttgggtt 29820  
 ttcagatgtt ggatttccca tatggggggc atgtgagttc atcatcttcc ataataatg 29880  
 ttgatcaac tggattttct ctcttcttct caccagcctg gaggagaacc atctccagga 29940  
 tgaagggtga tgttctctcg cagaaggact gaagaaaaat tcaagtttga aaatcctgaa 30000  
 gtaaggaaac cataagcagg aaacaggaca ataattgctg gcctttggaa ggggcatttc 30060  
 tgattaaagt ctgggcccgt ctccgctggg ctaactcatg tgaggtggcc tggtagaaca 30120  
 gcttgccctg gtctaggtgg acaaggattc cagtgaagt tgtttatctg ggaggtgggc 30180  
 ccagtaaatg ctgataggag agtgggtgaag tgagatgggg aagtgaagg aaccaataaa 30240  
 ggggagttat caagccagtt atcaatgagg gaaattggag ctcagtactc tggggcactc 30300  
 ctggagccag tgcaaacac acatggtcac ctacccaacc aatgggcaag aaagccatgg 30360  
 catttatcca ccaacctct gtcttctcta tgttgatgtg cgctcatggg gcaactgattc 30420  
 tccagcactt ccagctcacc ctacccagc tgaacatgct tctgggtgca ggagaatggc 30480  
 ctccagcaga gagtggcagg tcttctctgc aagcagtggt tggggagggt atgtgatggg 30540  
 gagtactgtg gctcctcca gtggctgact cagtggcttg ggacttgtgc cacaagaga 30600  
 tggacagctc aggtgaacat gaaccacact agtgaccatc atgggtttgt cagggtgctc 30660

tctgaggctg atgccaaaat tcttatttca agtagacctc aggaacccca tcagatggct 30720  
ccttttgctg gaggaagtgt gcatctgcct aggcataatgt ggtcctagga aaacgcttgc 30780  
ctttagagac agacagacag acagctgcct ctgtgagtg cagctttgct gccaggctgc 30840  
taccactct ggcgacactc atttgtgttg ctttcacaag ctaggaggtt tccaaatatt 30900  
tggagaaaac acttccacta attatttggg tggaaatggg ctgggaagt ggggtgaagc 30960  
ccggatgtgt ctgagccaga tgccagcttt gactgaggg tcggcctttg ggaataccaa 31020  
gccattatc aaccaggtgt ggatatggca ggtttgtctt cctccttgt cacagcctta 31080  
ctccacttga ctccatgga tgccaggcaa tgaggctggg gttggtccca tgccaccctg 31140  
tcacagcct tatttttcag catcctaaac tatatcatcc cccacaaaaa ttgaacttct 31200  
gatatatctt ttataaaaaa gagaaatgcc tacatcttct ttttccagga ttagtttctg 31260  
ccaagagtgt gttgagagcc caggcttgcct ggtgagctgt gctcacacct gtaatccag 31320  
cactttggga gctgagggc ggtgagctgt ctgaggtggg gagttccata ccagcctgac 31380  
caacatggag aaacccctc tctactaaaa atacaaaatt agccggcggt ggtggcatac 31440  
acctgtaatc ccatctactc aggaagctga ggcaggagaa tcacttgaac ctgggaggtg 31500  
gaggttgcca tgagccaaga tcacaccatt gcaccctaga ctggacaaga gagaaacttc 31560  
catctcaaaa aaaaaaaaaa ggtgagaaa aataataatt taaaaaaag agtccaggct 31620  
ctggaaccag acagcctggg tcttaccctt gctccaccat taccagccag ttcttcttgg 31680  
atgagtgcct cagttgcctc aagtgtaaat ggagataatg gctggacctt cattataggc 31740  
catgagcatt cactgagaga atgtagctaa caaagtgag ttgtaggttg gagcaaaagt 31800  
aattgtgggt tcagaccatg aactttaaat tattataact aggcataaat acatctttat 31860  
taatcaaaat aggaaccatt aaaatcaaca catttttggc aataagaaat aagtttgttt 31920  
attcctgtag cataaaaatt catgcttcgg gattcaacaa actcttggaa agcattttct 31980  
gcatcctcct ggttgtggaa gcatttttcc tgcaaaaagt tgtcaagatt cttgaagaaa 32040  
tggtagtcat ttggctagag gtcaggtaaa tatggcggat gaggcaaaac ttcatagtcc 32100  
aattcattca acttttgaag ctttgggtgt gtgacatgca gtccgggtgt tgtcgcggag 32160  
aattggaccc ttctgttga cgaatgccgg ttgcaggtgt tgcagtttcc agtgcctc 32220  
attgacttgc cgagcatact tctcatatgt aatggtttcc cagggattca gaaagctgta 32280  
gggatcaga ctgacagcag accaccagt accatgacct ttttttttg gtgcgaattt 32340  
gcctttggga agtgccttgg agcttcttct cggccaacc actgagctag tcattgccag 32400  
ttgtataaaa tccacttttc atcgcacgtc acaatcagat caagaaatgg ttcgtgttg 32460  
ttgtgtagaa taagagaaga tgacacttca aaatgacgat tttcttggtt ttcactcagc 32520  
tcatgaggca cacacttctc gaggttttcc acctttccaa tttgcttcaa atgctgaatg 32580  
accatggaaat ggtcgatgtt gagttctcaa gtatgtgtaa gaaaatcagc tttgatgatt 32640  
gctctcaatt ggtcattgtc agcttctgat ggccctgccag tacactcctc atcttcaagg 32700  
ctcttatctc cttcgcaaaa cttcttgaac caccactgca ctatacgta gttagcagt 32760  
cctgggccaa atgcattgct gatgttgtga gttgtctcc ctgctttaca acccattttg 32820  
aattcaaata agaaaattgc ttgaatttgc tttttgtcta acatcatttt catagtctaa 32880  
aataaatata aaataaacag aaagtattaa gtcattagca aaaaatcata aagtgagaat 32940  
tgtgcattaa aatgatgtat agcataacca catttattta agaattgatt ccaatatcaa 33000  
atggcaaat tcaacaatgc aaaaactgca attactttg caccaatcta atagaagttc 33060  
aataaatact ggcaattaca attggcattg ccttagggtc aacttgtaag acattcctga 33120  
aattgtggga aagggggagg acctggagtg gacattattg gaaggcaaag ctgtaacca 33180  
aagagcaacc tgggaaacac atgactcctc tgttgctgtc cctggcccta tctgtctcc 33240  
cctcctgtt gtcagctacc tcatatgttc tctaactctt gtctctgtgc cctcaaagac 33300  
ccccctgaaa atagaaatat tactgtcat tggttatttt ctatcaatta agtactgtat 33360  
tagtccgttt tcatgctgat gataaagata taccacagc tgggcacttt atgaaagaaa 33420  
gagttttatt gaacttacag ttccacgtgg ctggggaggt ctcacaatca tggctgaagg 33480  
tgaaaggcac atctcacatg gcagcagaca ggagaagagg gcttgttcag ggaaactccc 33540  
ctttttaaaa ccatcagata tcatgaaact tatttactgt aatgagaaca ggatgggatt 33600  
caattacctt cactgggtc gctcccacaa cacgtgggaa ttcaagagat ttgggtgggg 33660  
acacagcoaa accatatcaa gtactgtgca agtgttttag gcatgcagag agtgggtggg 33720  
cttccagca agcagagtgt ggggaggtaa tgggggactg gtggctgact taatggcca 33780  
ggaccatgc cacaaggaga tggatgggtg atgtgaatag gagcctgctt acaccatca 33840  
caatttagat tcttatgtc gatggcacgg gtactctttt aggccattt taccaatgag 33900  
gagattggga ctaatttgc cgagatcaaa aaagaagtgg tgtaggtggg atttaaaccc 33960  
aggatgtcta gcactaaaat gcaggtactt aaccactatc ctaaggaggt ggctacttaa 34020  
tttgataaac tcatctagt aatggaagag agacggttac atttactga tggactgag 34080  
cctttgttga tgagctcatt gggaatctca gacatgagca ggatgtgtct aaggacagg 34140  
tgggcttcag tagactggct aactcctgca gtctctttaa ctggacagtt tcaagaggaa 34200  
aaccaagaat ccttgaagct caccattgta tcttcttttc caggttgtcc aataactgca 34260  
tcacctacct aggggcagaa gccctcctgc aggcccttga aaggaatgac accatcctg 34320

```

aagtctggta aggccctgg gcaggcctgt tttagctctc cgaacctcag tttttctatc 34380
tgtaaaaatgg ggtgacggga gagaggaaatg gcagaatttt gaggatccct tctgattctg 34440
acattcagtg agaatgattc tgcattgtgaa ggatctgatt ctctgtctaa gaaagaagtc 34500
tttacctctt taagttagga gcaatgattt cattttttaa ccttgactat ttattcagca 34560
acttctctgc tctatgagat agtgtaggaa tggggatgtg gttgaagaat gaaaagaaaa 34620
gtcagctccc gccctcctag aaattgcac tgccttcaca ggtcaaggat attggatcag 34680
accttctgcg gttctgaatg gagattacac aggttaggag caggttgcac agtgtttcca 34740
attctctata attaaagcca tagactttca tgtattgaaa aaagcaagaa ttgcattctt 34800
gacagattct ttcatgtcct taaaaagaat gactagcctt gggagtctgg gcagctgggt 34860
ccagtgttgt agactttctc tctgctgagc cacagcttca aagatttgtc cttcttgttt 34920
ccagggatct atttctcaga caataagtaa aggctttccc tggcctaagt tgctgtaagt 34980
gaatccttact atatatgttc caggcactgg gctagagact aatattttaa agccaggaaa 35040
tttctctatag aaaatctata tctcagggtt ttctcaaaag agctgggaac tctggatgcc 35100
cattcatgat tccagtagtt aaccagagta caagaagggc tgagtcttct cagatgggca 35160
aaccactctt ggctgactgc agatccacca agcctattgt cttagaccag gaccttttgg 35220
caactcattc ccataagcct gtgacccttg ctttaaatat gcaggccttg tcttctctca 35280
aaaagcacat caaggctgca gcgaatgcag atatcaaag atgaagttaa aaacaaaagc 35340
tttgctgggc gtggcagctc acacctgtaa tcctagcact ttgggaggtt gaggcaggag 35400
gatcacttta ggcagaggtt tcaacaccag acctgtctc tcaaaaaata aaaaattcag 35460
ctgggtgcgg tgtagtctct agccacttgg gaggctggga tgggaaggatc ccttgaacct 35520
aggagttaa ggctgcagtg ggccatgatt gcatcactgc acaggcgaca gaattagatc 35580
ccatctctta aaaaaataaa aaatttataaa gtgacttcaa aaatctatgc tgtgatggag 35640
agatttttcc ttctgtatga ttgtgatagc tctgtggcct atgacgtcat caggttctgg 35700
gcaaagtgtg ggttttctgt ttctttgttt ttgaaacct tgacagtcac taagaaacat 35760
cacattctgg gtcttgggca ccagccaaca tgaggtgagg gcaccagggt ttgctcattg 35820
cattcttgac agattctctt attgccttaa aaagaatcac tggccttggg gagtctgtgg 35880
ctggctgggt gcagtgttgt ggactctctc tgcagagtca tggagccttg ttcagaatgc 35940
ttcttgagct gccctggttg gccaaaggta aaaacagccc tgacttccct gcaagaaaca 36000
ctgcagctgg gccagagagt cagcccatcc caggcatggg tttaaaaagt ggaggctttt 36060
gttgaaagc cctgtcttaa tttgtcctc actcaaacct ctgttactt gatctgcttt 36120
aggctccgag ggaacacttt ctctctagag gaggttgaca agctcggctg cagggacacc 36180
agactcttgc tttgaagtct ccgggaggat gttcgtctca gtttgtttgt gaggagctg 36240
tgagttttgg cccagagggc tgggtgacat gtgttggcag cctcttcaaa atgagccctg 36300
tcttgcttaa ggctgaactt gtttcttggg aacaccatag gtcaccttta ttctggcaga 36360
ggaggggagca tcagtgcctt ccaggataga cttttcccaa gcctactttt gccattgact 36420
tcttcccaag attcaatccc aggatgtaca aggacagccc ctctccata gtatgggact 36480
ggcctctgct gatcctccca ggcttccgtg tgggtcagtg gggcccatgg atgtgcttgt 36540
taactgagtg ctttttgggt gagaggcccc gcctctcaca aaagacccct taccactgct 36600
ctgatgaaga ggagtacaca gaacacataa ttcaggaagc agctttcccc atgtctcgac 36660
tcatccatcc aggcattccc ccgtctctgg ttctccct cctcctggac tctgcacac 36720
gtccttctct ctgaggctga aattcagaat attagtgacc tcagctttga tatttcaact 36780
acagcacccc caaccctggc acccagggtg ggaagggtta caccttagcc tgccctcctt 36840
tccggtgttt aagacatttt tggaaaggga cacgtgacag ccgtttgttc cccaagacat 36900
tctaggtttg caagaaaaat atgaccacac tccagctggg atcacatgtg gacttttatt 36960
tccagtgaat tcagttactc ttcagttaag cttttggaaa cagctcgact ttaaaaagct 37020
ccaaatgcag ctttaaaaaa ttaatctggg ccagaatttc aaacggcctc actaggcttc 37080
tggttgatgc ctgtgaactg aactctgaca acagacttct gaaatagacc cacaagaggc 37140
agttccattt catttgtgcc agaatgcttt aggatgtaca gttatggatt gaaagttaa 37200
aggaaaaaaa attaggccgt tccttcaaa ccaatgtctt cctggattat tcaaaatgat 37260
gtatgttgaa gcctttgtaa attgtcagat gctgtgcaaa tgttattatt ttaaacatta 37320
tgatgtgtga aaactggtta atatttatag gtcactttgt ttactgtct taagtttata 37380
ctcttataga caacatggcc gtgaacttta tgctgtaaat aatcagaggg gaataaactg 37440
ttg 37443

```

```

<210> 4
<211> 1315
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<220>

```

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (117)..(1118)

&lt;400&gt; 4

```

cgatcagaag caggtcacac agcctgtttc ctgttttcaa acggggaact tagaaagtgg 60
cagccccctcg gcttgtcgcc ggagctgaga accaagagct cgaaggggcc atatga cac 119
                                                                His
                                                                1

tcc tcc cgg acc cct gga cac aca cag ccc tgg aga ctg gag cct tgg 167
Ser Ser Arg Thr Pro Gly His Thr Gln Pro Trp Arg Leu Glu Pro Trp
                    5                      10                      15

agc atg gca agt cca gag cac cct ggg agc cct ggc tgc atg gga ccc 215
Ser Met Ala Ser Pro Glu His Pro Gly Ser Pro Gly Cys Met Gly Pro
                    20                      25                      30

ata acc cag tgc acg gca agg acc cag cag gaa gca cca gcc act ggc 263
Ile Thr Gln Cys Thr Ala Arg Thr Gln Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly
                    35                      40                      45

ccc gac ctc ccg cac cca gga cct gac ggg cac tta gac aca cac agt 311
Pro Asp Leu Pro His Pro Gly Pro Asp Gly His Leu Asp Thr His Ser
                    50                      55                      60                      65

ggc ctg agc tcc aac tcc agc atg acc acg cgg gag ctt cag cag tac 359
Gly Leu Ser Ser Asn Ser Ser Met Thr Thr Arg Glu Leu Gln Gln Tyr
                    70                      75                      80

tgg cag aac cag aaa tgc cgc tgg aag cac gtc aaa ctg ctc ttt gag 407
Trp Gln Asn Gln Lys Cys Arg Trp Lys His Val Lys Leu Leu Phe Glu
                    85                      90                      95

att gct tca gct cgc atc gag gag aga aaa gtc tct aag ttt gtg gtg 455
Ile Ala Ser Ala Arg Ile Glu Glu Arg Lys Val Ser Lys Phe Val Val
                    100                      105                      110

tac caa atc atc gtc atc cag act ggg agc ttt gac aac aac aag gcc 503
Tyr Gln Ile Ile Val Ile Gln Thr Gly Ser Phe Asp Asn Asn Lys Ala
                    115                      120                      125

gtc ctg gaa cgg cgc tat tcc gac ttc gcg aag ctc cag aaa gcg ctg 551
Val Leu Glu Arg Arg Tyr Ser Asp Phe Ala Lys Leu Gln Lys Ala Leu
                    130                      135                      140                      145

ctg aag acg ttc agg gag gag atc gaa gac gtg gag ttt ccc agg aag 599
Leu Lys Thr Phe Arg Glu Glu Ile Glu Asp Val Glu Phe Pro Arg Lys
                    150                      155                      160

cac ctg act ggg aac ttc gct gag gag atg atc tgt gag cgt cgg cgc 647
His Leu Thr Gly Asn Phe Ala Glu Glu Met Ile Cys Glu Arg Arg Arg
                    165                      170                      175

gcc ctg cag gag tac ctg ggc ctg ctc tac gcc atc cgc tgc gtg cgc 695
Ala Leu Gln Glu Tyr Leu Gly Leu Leu Tyr Ala Ile Arg Cys Val Arg
                    180                      185                      190

cgc tcc cgg gag ttc ctg gac ttc ctc acg cgg ccg gag ctg cgc gag 743
Arg Ser Arg Glu Phe Leu Asp Phe Leu Thr Arg Pro Glu Leu Arg Glu
                    195                      200                      205

```



gct ttc ggc tgc ctg cgg gcc ggc cag tac ccg cgc gcc ctg gag ctg 791  
 Ala Phe Gly Cys Leu Arg Ala Gly Gln Tyr Pro Arg Ala Leu Glu Leu  
 210 215 220 225

ctg ctg cgc gtg ctg ccg ctg cag gag aag ctc acc gcc cac tgc cct 839  
 Leu Leu Arg Val Leu Pro Leu Gln Glu Lys Leu Thr Ala His Cys Pro  
 230 235 240

gcg gcc gcc gtc ccg gcc ctg tgc gcc gtg ctg ctg tgc cac cgc gac 887  
 Ala Ala Ala Val Pro Ala Leu Cys Ala Val Leu Leu Cys His Arg Asp  
 245 250 255

ctc gac cgc ccc gcc gag gcc ttc gcg gcc gga gag agg gcc ctg cag 935  
 Leu Asp Arg Pro Ala Glu Ala Phe Ala Ala Gly Glu Arg Ala Leu Gln  
 260 265 270

cgc ctg cag gcc cgg gag ggc cat cgc tac tat gcg cct ctg ctg gac 983  
 Arg Leu Gln Ala Arg Glu Gly His Arg Tyr Tyr Ala Pro Leu Leu Asp  
 275 280 285

gcc atg gtc cgc ctg gcc tac gcg ctg ggc aag gac ttc gtg act ctg 1031  
 Ala Met Val Arg Leu Ala Tyr Ala Leu Gly Lys Asp Phe Val Thr Leu  
 290 295 300 305

cag gag agg ctg gag gag agc cag ctc cgg agg ccc acg ccc cga gcc 1079  
 Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ser Gln Leu Arg Arg Pro Thr Pro Arg Gly  
 310 315 320

atc acc ctg aag gag ctc act gtg cga gaa tac ctg cac tgagccggcc 1128  
 Ile Thr Leu Lys Glu Leu Thr Val Arg Glu Tyr Leu His  
 325 330

tgggaccccg cagggacgct ggagatttgg ggtcaccatg gctcacagtg ggctgtttgg 1188

ggttcttttt ttttattttt ccttttcttt tttgttattt gagacagtct tgctctgtca 1248

cccagactga agtgcagtgg ctcaattatg tctcactgca gcctcaaact cctgggcaca 1308

agcaatc 1315

<210> 5  
 <211> 334  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 His Ser Ser Arg Thr Pro Gly His Thr Gln Pro Trp Arg Leu Glu Pro  
 1 5 10 15

Trp Ser Met Ala Ser Pro Glu His Pro Gly Ser Pro Gly Cys Met Gly  
 20 25 30

Pro Ile Thr Gln Cys Thr Ala Arg Thr Gln Gln Glu Ala Pro Ala Thr  
 35 40 45

Gly Pro Asp Leu Pro His Pro Gly Pro Asp Gly His Leu Asp Thr His  
 50 55 60

Ser Gly Leu Ser Ser Asn Ser Ser Met Thr Thr Arg Glu Leu Gln Gln

65	70	75	80
Tyr Trp Gln Asn Gln Lys Cys Arg Trp Lys His Val Lys Leu Leu Phe	85	90	95
Glu Ile Ala Ser Ala Arg Ile Glu Glu Arg Lys Val Ser Lys Phe Val	100	105	110
Val Tyr Gln Ile Ile Val Ile Gln Thr Gly Ser Phe Asp Asn Asn Lys	115	120	125
Ala Val Leu Glu Arg Arg Tyr Ser Asp Phe Ala Lys Leu Gln Lys Ala	130	135	140
Leu Leu Lys Thr Phe Arg Glu Glu Ile Glu Asp Val Glu Phe Pro Arg	145	150	155
Lys His Leu Thr Gly Asn Phe Ala Glu Glu Met Ile Cys Glu Arg Arg	165	170	175
Arg Ala Leu Gln Glu Tyr Leu Gly Leu Leu Tyr Ala Ile Arg Cys Val	180	185	190
Arg Arg Ser Arg Glu Phe Leu Asp Phe Leu Thr Arg Pro Glu Leu Arg	195	200	205
Glu Ala Phe Gly Cys Leu Arg Ala Gly Gln Tyr Pro Arg Ala Leu Glu	210	215	220
Leu Leu Leu Arg Val Leu Pro Leu Gln Glu Lys Leu Thr Ala His Cys	225	230	235
Pro Ala Ala Ala Val Pro Ala Leu Cys Ala Val Leu Leu Cys His Arg	245	250	255
Asp Leu Asp Arg Pro Ala Glu Ala Phe Ala Ala Gly Glu Arg Ala Leu	260	265	270
Gln Arg Leu Gln Ala Arg Glu Gly His Arg Tyr Tyr Ala Pro Leu Leu	275	280	285
Asp Ala Met Val Arg Leu Ala Tyr Ala Leu Gly Lys Asp Phe Val Thr	290	295	300
Leu Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ser Gln Leu Arg Arg Pro Thr Pro Arg	305	310	315
Gly Ile Thr Leu Lys Glu Leu Thr Val Arg Glu Tyr Leu His	325	330	

<210> 6  
 <211> 8135  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> exon  
 <222> (1)..(161)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (3812)..(3950)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (5426)..(5577)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (7273)..(8135)

<400> 6  
 cgatcagaag caggtcacac agcctgtttc ctgttttcaa acggggaact tagaaagtgg 60  
 cagcccctcg gcttgtcgcc ggagctgaga accaagagct cgaaggggcc atatgacact 120  
 cctcccggaac ccttggaacac acacagccct ggagactgga ggtcagtatt tgatcccaag 180  
 ctgagctgtc ctctgcctgc tgtggcctga gtccccttct cctggggccc tgcctggcac 240  
 ctgctggggg caggtgaggg gggggaagag ttagtgacag ccgctgtgtc tggagctctc 300  
 cttagcacac tgaggcagag gaaggacag ctccctggacc ttccatcacc tccattcctt 360  
 ttgaaatgct agcgcttgt acaacccatc ttgggcctgg agaataagtc accacacctg 420  
 tgtttctcaa aagaacagtg tcagggaacc cctgcctcag cacagcctta gaggactcat 480  
 ggaaaatgca gaatccaggc ctgttcaatg gcaccttctt atgttagcag ccaggaaacc 540  
 tgcctcttga caagcccctg ggatcccacc cccaccccac caggggatcc ttacacacac 600  
 tgggttggga gcccttggtt ttgcaaggc ttctcaggtg agcgtccagt tgttggaggg 660  
 taccacacct tcccccaaga gaggcagcca cacatccaac atcctgggat ctctgtctcc 720  
 cagcgtgggc catgtgcttt atttcacccc ctagaggctc atcccccatg aaaagtccct 780  
 cgcaggccct cagaaagata gtgtggcctc tgttgccca gcagaagaag gactggactt 840  
 ggcagtcagc tcttgagag ggggtggtta ggacacctgg ggacaggagg aggagaatga 900  
 ctgtctgtgc acacacggct ggaaggtaca ggaggtggg aagctgctct gtcccctggg 960  
 ccaactacag gcccccaggc caacagcaac aacactttta gtattttgtt ataaagtcaa 1020  
 gaaatctttg ctacagaggg tgaggagagg gaaggaaagg gccatggaac cgtctatgtg 1080  
 gctatcccca gagagctttt agagtgcag gattgctttc ccatttcaca gatgaggaaa 1140  
 ctgaggcctg gagaggatg ggaagctacc caaggcccca tggatacacc agtgacacac 1200  
 tctttccttc cccctcctct ttaaatgggt gattcccaat gaaacctgta agagacaacc 1260  
 ataagggagc tgactgtggc tgcctgaattt gattttattc taaggcctgg ttttataatc 1320  
 agctttctca gtctttactg gagtgtcaag ccgaggcatc atttctaggg tcttacaggg 1380  
 tctctgggcc aatagtggcc tgcctctgac ctggagccag ctgcctgggc atgaaagcag 1440  
 atctgcaaag gctggggccc ctgaggccaa ggcactcgc catcacccat tttacagaag 1500  
 tgctgagcat aggagtggcc tgggccccca agaatcccag ccaccaagaa tcacgtaaac 1560  
 catccactgt ctcacttagg caccagtcat aatgtaggga acccaccctt agtcatccat 1620  
 catcttatca acaggacggg gcttgtagcc acatttatca ggtagggaaa ctgaagccta 1680  
 gagatattaa agcacttgct taaggacaca cggttggtca ggtagggaag cgatgtctcc 1740  
 tgactccctg acaggcacia gagacaagcg agagggtgcc gtgacggcat gctcaagaac 1800  
 gtgcagccct gggccagcca ggcctctgct ccgtgcctct gtttgcccat ctgtaaaagg 1860  
 tgaggttggg tcgaggggtc ctgagggccg cccactggat ggctgtgcag agccaaacgg 1920  
 agaaggcccc agggttcctt tcacccgaca cagcaagcac ttccccctga agtgacaggc 1980  
 ccaggcccca gctgacctcc cctctcccag gccagcggct ctacccctg gagcaaggga 2040  
 caggcgctgg ctgtgctcag ggacatgcat gactcccgcc cccatctgtg ctgaggggtt 2100  
 gccagggagg cactggctct atctttctct aggccgtagt cagcccaggg gttcagacca 2160  
 agagcccaga atccaacaga tcagagttca agtcccagct ctacctctat gttccactgg 2220  
 cagcttcctc aggtcatttg caccttcctt gtcttgaatt tccatgccta accagtatac 2280  
 cagctactcc ctccagccga tctaattgtt taattgtccc tttctctaag ttgtctcaa 2340  
 catttgtaat tctattccaa tccaccttaa ttagtgcatt tatttcacaa atatttctgg 2400  
 aaacatctag cacttaacag acactaaaag cgggggtact acacagtcct tgggatggac 2460  
 agggccctga gctgaggctt cagagtctgc ctgactgaat cctcacccca gccttgtgaa 2520  
 cgtgggttct gttattatcc ccaatttata ggaaacagaa gcacagagaa gttgagtcac 2580  
 ttgccagcta ccaggctatc ccttccactt atccgggtca cagacagagt tattatgtaa 2640  
 accagatccc agctgcctgt tctccctccc tgagtaagggt ggagagaatt ctgaagtcag 2700  
 ccagcctgg gtctgtatcc tgcccaccac tcaccagctc ctcatcttgg gcaactctaa 2760  
 gtctcagttc ccttatcata aaaggagat gtaaacagtc ctgagtgca acagtgttca 2820  
 ggttagtgca agagtgtgtg ctgggtgtga agtgacagc cagcacgtca caagcactgg 2880

agacaaattc agcttttgctt gttgcgacaca ctcaccagct gcgtgacttt agacctcagt 2940  
 tttctcatct gttatgtggt ggtaatgata gacttttgtg agcattaaac tagattaggg 3000  
 gctatggaga acctagatgg gtatgaagtg ggtataataa gctatcagtt aattttgctg 3060  
 atagatagat tattgattga ttgatcgata gaagattcat accagtatct acctgctctg 3120  
 aacctgacc tttctttttt tcttttttgag atggtcttgt tctgtcaccc agactggagt 3180  
 gcagtggcat catcatagct cactgcagcc tcagtctctt gggcctaagg gatcctcctg 3240  
 tctcagccct ccaagtagct gggaccacag gcgtgcatcc tggataattt ttttttattt 3300  
 tttctagaga cgggtctca ctacattggc caggctggtc tcaaattcct gggctcaagt 3360  
 gatccttcta acccagccct ccaaagcgt gggattacag gcatgagtgg ccatgttcaa 3420  
 cttgaacct gagacttcat tcgcatgtgt aacataaaac tgagtatcta gacaagccag 3480  
 catctttctt tcaagtaate actaaagcca atacttttac ttgaaatcat ctcatttaaa 3540  
 actctgagca atacgtaagg atcacctcaa taacatatgg atcatcgcaa taggtgaagg 3600  
 gtcttctctg ccttggaagta acctgccag caaaggggca gaccagatt tgggatctgg 3660  
 cagctgggag agtggggaag gttgagccgt ggggcccttg tcattccctc tgcctgccag 3720  
 gagggggcat gacacagctc ctaggcacc caggagccac cgggaacccc aactggagtg 3780  
 ggtcctcact gttctctttt tctcttgga gccttgagc atggcaagtc cagagcacc 3840  
 tgggagccct ggctgcatgg gaccataac ccagtgcag gcaaggaccc agcaggaagc 3900  
 accagccact ggccccgacc tcccgcaccc aggacctgac gggcacttag gtgggcttga 3960  
 ggcttgagac tcggtctggg ggagaggtct gaagacattc aaagtacaaa tgtgggtcac 4020  
 tttgggggag gcagcaagag gcccgggcag ctctgttaac ttgggttacc ccaaaacaga 4080  
 cactgagaca cagcatagtg gcaagctgtt tatccgggag acggtcctag gagtcatggc 4140  
 aggggagtggt gaatggaagg aaagggaag agggcagggc aggacatcag tgaacagata 4200  
 ggcacggtag gtggctgaag ctcaacccca gcgggggtct tctgggagac cctggaacat 4260  
 atctctgggt tgtcctatcc taggggtgag gaagccgggc tgttatctac cagtcctgcc 4320  
 ctgcatagga gaaggacgc tcctggccct gctgctatgg ccctagaaaag ccctcagggg 4380  
 agccagtggc atgttctgga aaagtgggtg ccaagagggc acggtccagc ctggggcatg 4440  
 gacagcatct gctgtagtgc catctcctgg aacagatctt ttcttacagt ccttcgagat 4500  
 gccctattca atacctgctc tgttcctggc cctatgcagg gcaactggaga aacagaaaca 4560  
 ggaagaaatc aaacactgca ctagtctga ggtttggtag agaaacagat cagtgaagaa 4620  
 cagttacacg tgccacgaga aataaataaa taaaatgaaa aacctgtagg aacaaggtgg 4680  
 gaagctctta ctctaagcc aaggggcatt tgcagtgatg tgggggctgg gtcttgaagg 4740  
 gtagactgga aaaggctgg gacccatgcc ctttgcaata aaatgcacaa ttatttggc 4800  
 ttcttaagaa cctcagagtg gcgcagggt caagtgggt ttaagaacaa ctgtgttcgt 4860  
 tttcaggcg tggaatatga ggggttgatg caagcagag cagtgcagtc ccgagaagag 4920  
 cccgcattgt gggcagttag atgagaaggt taggaagggc cagcccgtg aggctggaac 4980  
 ataacatcct cctcactgcc tcccctgccc actgatgtgt gctcaaggag tctgggcaac 5040  
 agtcacgaag tcagggtgc agggagcaca gaaacacaca agccaccgtc tctgcttgc 5100  
 cagagcaggg atttcaccat ggccaatcta cagaccagaa gtggacgatg caaagtgcc 5160  
 gcaccgcatt ccaaagctgt gaaaccactt gggggtgatg ggctatttgg gattgtcgg 5220  
 ggtaggtgg attctgccag gctgggcaca gaagtctgtc tgatgcccc attgggccta 5280  
 taaatggcg ggtggagag agggatattc aatactctc aggagtctg atatgccatc 5340  
 tcagatagac ccagccatct ccccaagccc atgcctcgga agtgcaactga cagggtgca 5400  
 atccttaagg gtgtgtcct tccagacaca cacagtggcc tgagctccaa ctccagcatg 5460  
 accacgcggg agcttcagca gtactggcag aaccagaaat gccgctggaa gcacgtcaa 5520  
 ctgctctttg agatcgcttc agctcgcatc gaggagagaa aagtctctaa gtttgggtg 5580  
 agcagagatt gggaaatggt ggagcctctt tcaactctgt tccttctgg ccctgaataa 5640  
 gtcttgtaga gccctagggt tcccaactat gaaatgggtc aacacactaa ctcacagctt 5700  
 tcttctggag aaaaatggcca aagagcaaga tttcaggctc agcacctgct agggctctgtg 5760  
 aggatcga ccatataagt catatttctt ggtcccaaga aggaatagc ccagttaaat 5820  
 cccatcttat cagggtgcag tcacctgtgt cctttcttca ccaattttgc catatcactg 5880  
 tatctgttct aattattatt acttattttt ttctttaa attgatcactt tttaaaaaca 5940  
 tgaagcacat ttatttcaaa gagaaatacc ttaaattggaa aaccaatata acatggcaca 6000  
 aagcaaaagt aacatactag aaaagtcgat acaaggaaag tcaatacaag gaaagctatg 6060  
 tgtgttatt aaattctagc tggttactgt ggcttcggga aagccctgtg cctgggagct 6120  
 gctcctctcc ctgttagaat ggaattttag cttgtgttaa gggatgttaa agactgccta 6180  
 agagccacac ttcatccttc tccttcaactt acctgggacc gggataaata acatagctac 6240  
 cactgaatgc caatggcatg ccgggcacag ctccatgtgg tttcagtga ttaactcatt 6300  
 taatcctcac tgggtgaggt aggcactatg cctatccttg ttttatgaat gagaaaagtg 6360  
 agactcggag aggttaaatt actcatctaa aaccacacag ctagaccatg gtagggctat 6420  
 aattacaacc catgcaatct ggctctggag tcagatgcatt ggggtataat tgcccttaat 6480  
 atataattgc ccgtaatcag gattctcttg aaagatgatt gaaaaggatt gattttctta 6540

```

ccatataacg gcatcaccag tgtacctaaa tgatgttata ttgtacgtaa aactaattcc 6600
caagtgtgaa acatttggaa aacacagcat ctgagttcag aaaacagagg cccagtttta 6660
gcaagtaaag ccaagagggg ccccagcagc ctgcagggca ggacctctct cctttctctc 6720
tcccagatgt ccccaccttg ctgtgttgtt gttccagggt tgactcagct gatgccaata 6780
gcaatttaaa acagaattgg gccaggtgca gtggctcatg cctgtaatcc cagcactttg 6840
ggaggccccag gtaggaggat cgcttgagcc caggagttgg agaccagcct gggcaacaca 6900
gccagacccc atcttttaaa aagaatcaaa aaatctgcca ggtagtgggt gtgcctgtag 6960
tcccagctac tcaggaggct cagggtggga ggtcaattga gcccataagt tcaaggttgc 7020
agtgagggtat gatcgcatca ctgtactcca gcctgggtaa cagtgcgaga ccctgtctct 7080
aaaaataaat aaataataaa ataaataaat aaataaaca acaaacaaac aaacaaaca 7140
tcaattgcat ataaggatcg cccgttttca gggcatgctt tacaccggcc tggttaactt 7200
tactctgggt gtgctccgtc cgccgcagcc cccgccggga ggtggccaca gctctctctg 7260
gttgccgccc aggtgtacca aatcatcgct atccagactg ggagctttga caacaacaag 7320
gccgtcctgg aacggcgcta ttccgacttc gcgaagctcc agaaagcgtc gctgaagacg 7380
ttcaggaggag agatcgaaga cgtggagttt cccaggaagc acctgactgg gaacttcgct 7440
gaggagatga tctgtgagcg tcggcgcgcc ctgcaggagt acctgggcct gctctacgcc 7500
atccgctgcg tgcgccgctc cggggagttc ctggacttcc tcacgcggcc ggagctgcgc 7560
gaggctttcg gctgcctgcg ggccggccag taccgcgcgc cctggagct gctgtgcgc 7620
gtgctgccgc tgcaggagaa gctcaccgcc cactgccctg cgccgccgt cccggccctg 7680
tgccgcgtgc tgctgtgcca ccgcgacctc gaccgccccg ccgaggcctt cgccggccga 7740
gagagggccc tgcagcgctt gcaggcccg ggaggccatc gctactatgc gcctctgctg 7800
gacgccatgg tccgcctggc ctacgcgctg ggcaaggact tcgtgactct gcaggagagg 7860
ctggaggaga gccagctccg gaggcccaag ccccgaggca tcacctgaa ggagctcact 7920
gtgcgagaat acctgcaact agccggcctg ggaccccgca gggacgctgg agatttgggg 7980
tcaccatggc tcacagtggg ctgtttgggg ttcttttttt ttatttttcc ttttcttttt 8040
tgttatttga gacagtcttg ctctgtcacc cagactgaag tgcaagtggc caattatgtc 8100
tcactgcagc ctcaaactcc tgggcacaag caatc 8135

```

```

<210> 7
<211> 16
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 7
ctgggtgcga ttgctc 16

```

```

<210> 8
<211> 16
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 8
ccaggcccca tgacag 16

```

```

<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 9
tggccccgc ccaatcccaa tgctt 25

```

```

<210> 10
<211> 28
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

<400> 10  
ttcctcatgt ataaattggg tgtggcca

28

<210> 11  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
acagagtgag gaccccatct ctatc

25

<210> 12  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
tccaactgct gggattacag gcaca

25

<210> 13  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
agtccccgag accagggcaa ac

22

<210> 14  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
tccatttctg cagtacacat gca

23

<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
ctctcccatc agaaggcatc

20

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
ggatagagac gttctcttaa

20

<210> 17  
<211> 20  
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

caggctgaat gacagaacaa

20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

attgaaaaca actccgtcca

20

<210> 19

<211> 25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

atactcactt ttagacagtt cagg

25

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

ggctcagttc ctaaccagtt c

21

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

agtcagtctg tccagaggtg

20

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 22

tgaatcttac atcccatccc

20

<210> 23

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

gatcttccca aagcgcc

17

<210> 24

<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 24  
tcccgtcagc caagcta

17

<210> 25  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 25  
aagcttgat ctttctcagg

20

<210> 26  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 26  
atctaccttg gctgtcattg

20

<210> 27  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 27  
cctccataat catgtgagcc

20

<210> 28  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
aatctcccca actcaagacc

20

<210> 29  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
ggatgcctgc tctaaatacc

20

<210> 30  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
cccaggggtc aaacttaat

19



<210> 31  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
ggtttgaaag tatctccagg g 21

<210> 32  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 32  
ggtttgaaag tatctccagg g 21

<210> 33  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
gtgcatgtgt tcgtatcaac 20

<210> 34  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
tcattctcaa aggagtttct 20

<210> 35  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
aaagccaacc ttgcttca 18

<210> 36  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
tcttggaac aggtaagtgc 20

<210> 37  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 37

attgccctca agaacagc

18

<210> 38  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 38  
gtgctatgcc atcccag

17

<210> 39  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 39  
ccacaccagc gtttttctaa

20

<210> 40  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 40  
cacactttac acacacctat accc

24

<210> 41  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 41  
aagccatatt aggtctgtcc at

22

<210> 42  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 42  
gcttgggtta aatgcgtgt

19

<210> 43  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 43  
agcagtttgg gtaaacattg

20

<210> 44  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 44  
aaatatgcct tctggagggtg

20

<210> 45  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 45  
ggaggatcag gggagtttat

20

<210> 46  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 46  
caaagtaaataaat gaatgtctac tgcc

24

<210> 47  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 47  
ccaactctgt agtttcaaag agc

23

<210> 48  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 48  
tcacagccta cttgcttggt

20

<210> 49  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 49  
gacagcctca aatgaaatat aacac

25

<210> 50  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 50  
gctctcagct agggtagttg tttat

25

<210> 51  
<211> 25

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 51  
attttttaagg aatgtaaagn acaca 25

<210> 52  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 52  
gaccaggagt cagtaaaagg 20

<210> 53  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 53  
gtccaaaaca ccaccctcta 20

<210> 54  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 54  
gaagtagatc agtcattctg ctgc 24

<210> 55  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 55  
tcctctgggg gattcactc 19

<210> 56  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 56  
gggacatcac caagcacaag 20

<210> 57  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 57  
caggaaaata aatctaacac acata 25

<210> 58  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 58  
cctgtgggca ctgataaata 20  
  
<210> 59  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 59  
cccagcccc atctcaccg 19  
  
<210> 60  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 60  
cccagcccc atctcacca 19  
  
<210> 61  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 61  
ctgcggagga ggctgctgg 19  
  
<210> 62  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 62  
tcactccac caccctttc 19  
  
<210> 63  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 63  
agaagtttag tgtggcgtgg 20  
  
<210> 64  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 64  
gccatctccc caagccc 17

<210> 65  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 65  
tcgatgcgag ctgaagcg 18

<210> 66  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 66  
tcgatgcgag ctgaagca 18

<210> 67  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 67  
tgaatgttaa agggctctgg 20

<210> 68  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 68  
ttggttctca gctccggcg 19

<210> 69  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 69  
ttggttctca gctccggca 19

<210> 70  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 70  
agaaaccggg ctggctgtg 19

<210> 71  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 71  
gcattgcctt ttgatctcta c

21

<210> 72  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 72  
tgggctcttc tgcgggga

18

<210> 73  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 73  
tgggctcttc tgcggggg

18

<210> 74  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 74  
tgcctcttct tctgccttcc

20

<210> 75  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 75  
cgagctgtac ctgaggaagc gt

22

<210> 76  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 76  
cctgagctgt acctgaggaa gcgc

24

<210> 77  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 77  
catcatgagc ccggggtggc

20

<210> 78  
<211> 23  
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 78

tttctcttggtg cttcctggtg cgt

23

<210> 79

<211> 25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 79

accttctctt ggcttcctgg tgcgg

25

<210> 80

<211> 26

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 80

gccaaaggtg tcgtgccagg gctcca

26

<210> 81

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 81

atctgagaag gccctgctct

20

<210> 82

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 82

atctgagaag gccctgctcc

20

<210> 83

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 83

cccacactta gccttgatg

19

<210> 84

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 84

atgagttagc ccagcggag

19

<210> 85



<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 85  
attgagagcc cttggagtg  
  
<210> 86  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 86  
tgatttcgta agacaagtg  
  
<210> 87  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 87  
agcaaattct aggagttatg  
  
<210> 88  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 88  
agctgagatg tccggatcg  
  
<210> 89  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 89  
agctgagatt ccggatca  
  
<210> 90  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 90  
gtcctcttaa cttcccttcc

19

19

20

19

18

20



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2806739

N° d'enregistrement  
national

FA 591027

FR 0003832

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AC007728, 7 juin 1999 (1999-06-07) DOE JOINT GENOME INSTITUTE: "Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-327F22, WORKING DRAFT SEQUENCE, 1 ordered pieces." XP002156657 voir complément inverse nts 136125-155466</p>	1-8,13, 18,19	<p>C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/63 C12N5/10 A01K67/027 G01N33/53 C12Q1/68 A61K48/00 A61K38/17 A61K39/395 A61P1/00 A61P29/00 A61P37/00</p>
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AC007608, 21 mai 1999 (1999-05-21) DOE JOINT GENOME INSTITUTE: "Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-401P9, WORKING DRAFT SEQUENCE, 8 ordered pieces." XP002156658 voir nts 30640-38779 te complément inverse nts 1-16166</p>	1-8,13, 18,19	
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: A0534686, 18 mai 1999 (1999-05-18) ZHAO, S., ET AL.: "RPCI-11-384F21.TJ RPCI-11 Homo sapiens genomic clone RPCI-11-384F21, genomic survey sequence." XP002156659 * le document en entier *</p>	1-8,13, 18,19	<p><b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</b></p> <p>C12N C07K C12Q G01N A61K</p>
X	<p>WO 99 64576 A (BURGESS CHRISTOPHER C ; BUSHNELL STEVEN E (US); CARROLL EDDIE III ( ) 16 décembre 1999 (1999-12-16) voir SEQ ID NO:365</p>	1-8,13, 18,19	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 janvier 2001		Maddox, A	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2806739

N° d'enregistrement  
national

FA 591027  
FR 0003832

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AI681116, 27 mai 1999 (1999-05-27) NCI-CGAP: "tx44b02.x1 NCI_CGAP_Lu24 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2272395 3', mRNA sequence." XP002156660 * le document en entier *	1-8,13, 18,19	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AQ585409, 9 juin 1999 (1999-06-09) ZHAO, S., ET AL.: "RPCI-11-459C5.TV RPCI-11 Homo sapiens genomic clone RPCI-11-459C5, genomic survey sequence." XP002156661 * le document en entier *	1-8,13, 18,19	
X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AI090427, 19 août 1998 (1998-08-19) NCI-CGAP: "oy82d10.s1 NCI_CGAP_CLL1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1672339 3', mRNA sequence." XP002156662 * le document en entier *	1-8,13, 18,19	
X	DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AQ176547, 21 septembre 1998 (1998-09-21) MAHAIRAS, G.G., ET AL.: "HS_3213_B1_C05_T7 CIT Approved Human Genomic Sperm Library D Homo sapiens genomic clone Plate=3213 Col=9 Row=F, genomic survey sequence." XP002156663 * le document en entier *	1-8,13, 18,19	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 janvier 2001		Maddox, A	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P4C35)



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2806739

N° d'enregistrement  
national

FA 591027

FR 0003832

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes			
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AW082334, 18 octobre 1999 (1999-10-18) NCI-CGAP: "xb65f03.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2581181 3' similar to contains LTR1.t3 LTR1 repetitive element ;, mRNA sequence." XP002156664 * le document en entier *</p>	1-8,13, 18,19		
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AA282390, 4 avril 1997 (1997-04-04) NCI-CGAP: "zs89a11.r1 NCI_CGAP_GCB1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:704636 5', mRNA sequence." XP002156665 * le document en entier *</p>	1-8,13, 18,19		
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AA278249, 3 avril 1997 (1997-04-03) NCI-CGAP: "zs77c05.r1 NCI_CGAP_GCB1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:703496 5', mRNA sequence." XP002156666 * le document en entier *</p>	1-8,13, 18,19		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AW134842, 29 octobre 1999 (1999-10-29) NCI-CGAP: "UI-H-B11-abs-e-09-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2713048 3', mRNA sequence." XP002156667 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-8,13, 18,19		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur		
8 janvier 2001		Maddox, A		
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>				

1

EPO FORM 1503 12.99 (PXC35)



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2806739

N° d'enregistrement  
national

FA 591027

FR 0003832

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AW104269, 21 octobre 1999 (1999-10-21) NCI-CGAP: "xd70h07.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2603005 3' similar to contains Alu repetitive element;contains element MER22 repetitive element ;, mRNA sequence." XP002156668 * le document en entier *</p>	1-8,13, 18,19	
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! ACCESSION NO: AI377313, 28 janvier 1999 (1999-01-28) NCI-CGAP: "te60b02.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2091051 3' similar to contains element MSR1 MSR1 repetitive element ;, mRNA sequence." XP002156669 * le document en entier *</p>	1-8,13, 18,19	
D,A	<p>HUGOT JEAN-PIERRE ET AL: "Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16." NATURE (LONDON), vol. 379, no. 6568, 1996, pages 821-823, XP002156655 ISSN: 0028-0836 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-23,25, 26	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 janvier 2001		Maddox, A	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2806739

N° d'enregistrement  
national

FA 591027

FR 0003832

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	MIRZA MUDDASSAR M ET AL: "Evidence of linkage of the inflammatory bowel disease susceptibility locus on chromosome 16 (IBD1) to ulcerative colitis." JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, vol. 35, no. 3, mars 1998 (1998-03), pages 218-221, XP000971943 ISSN: 0022-2593 * le document en entier *	1-23,25,26	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	HUGOT J P ET AL: "Fine mapping of the inflammatory bowel disease susceptibility locus 1 (IBD1) in the pericentromeric region of chromosome 16." GASTROENTEROLOGY, vol. 114, no. 4 PART 2, 15 avril 1998 (1998-04-15), page A999 XP000971941 Digestive Diseases Week and the 99th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association; New Orleans, Louisiana, USA; May 16-22, 1998 ISSN: 0016-5085 * le document en entier *	1-23,25,26	
A	WO 99 23255 A (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER ; UNIV LOUISVILLE RES FOUND (US); DIETZ) 14 mai 1999 (1999-05-14) * le document en entier *	1-23,25,26	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 janvier 2001		Maddox, A	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C15)



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche  
voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2806739

N° d'enregistrement  
nationalFA 591027  
FR 0003832

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>DATABASE SWISSPROT 'en ligne! ACCESSION NO: Q9Y239, INOHARA, N., ET AL.: "NOD1 protein" XP002156670 * le document en entier * -&amp; INOHARA, N., ET AL.: "Nod 1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 21, 21 mai 1999 (1999-05-21), pages 14560-14567, XP002156656 * le document en entier *</p>	1-23,25, 26	
A	<p>WO 99 40102 A (BERTIN JOHN ;MILLENNIUM PHARM INC (US)) 12 août 1999 (1999-08-12) * figures 3,10,18 *</p>	1-23,25, 26	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 janvier 2001		Maddox, A	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

**RECHERCHE INCOMPLÈTE  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 591027  
FR 0003832

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait  
l'objet de recherches complètes:  
1-23

Revendications ayant fait  
l'objet de recherches incomplètes:  
25 26

Revendications n'ayant pas fait  
l'objet de recherches:  
24(complètement) et, 25 et 26 partiellement

**Raison:**

Les revendications 24 et 25f,et 26 (pour autant qu'elle se réfères à 25f) présentes ont trait à un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir un composé capable d'interagir avec un acide nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 3. Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit pas un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT pour tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.



**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 591027  
FR 0003832

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

**1. revendications: 1-26 partiellement**

Acide nucléique et polypeptide caractérisé par le groupe de séquences SEQ ID NO:1,2, et 3, et des séquences présentant un pourcentage d'identité avec, ou fragments de, ou s'hybridant avec ces séquences 1,2, ou 3, comme définies dans les revendications, vecteur de clonage, cellule hôte, animal excepté l'homme, utilisation, procédé d'obtention d'un polypeptide, anticorps, trousse de réactifs, méthode de diagnostic, procédé de détection, procédé de criblage et composé, basés sur ces séquences

**2. revendications: 1-26 partiellement**

Acide nucléique et polypeptide caractérisé par le groupe de séquences SEQ ID NO:4,5, et 6, et des séquences présentant un pourcentage d'identité avec, ou fragments de, ou s'hybridant avec ces séquences 4,5, ou 6, comme définies dans les revendications, vecteur de clonage, cellule hôte, animal excepté l'homme, utilisation, procédé d'obtention d'un polypeptide, anticorps, trousse de réactifs, méthode de diagnostic, procédé de détection, procédé de criblage et composé, basés sur ces séquences

Toutes les inventions ont cependant été recherchées.